UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1936 *N° 39*

ÉTUDE

SUR LA

Gélatine et sa précipitation

Application à son essai et à son dosage dans les substances pharmaceutiques et alimentaires

Thèse pour le Doctorat d'Université
(Mention Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement en mars 1936

PAR

Robert BOUILLAUD

Pharmacien, Licencié ès Sciences, ex-interne des Hôpitaux de Toulouse.
Diplômé de l'Institut d'Hydrologie, Lauréat de la Faculté.

Membres du Jury

MM.	VALDIGUIÉ	*Président*
	RIBAUT	*Assesseurs*
	MOOG	
	BRUSTIER	
	DELAS	*Suppléant*

POITIERS
SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'IMPRIMERIE ET DE LIBRAIRIE
6 et 8, rue Henri-Oudin, 6 et 8

1936

ÉTUDE

SUR LA

Gélatine et sa précipitation

Application à son essai et à son dosage
dans les substances pharmaceutiques et alimentaires

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1936 — *N° 39*

ÉTUDE

SUR LA

Gélatine et sa précipitation

Application à son essai et à son dosage dans les substances pharmaceutiques et alimentaires

Thèse pour le Doctorat d'Université
(Mention Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement en mars 1936

PAR

Robert BOUILLAUD

Pharmacien, Licencié ès Sciences, ex-interne des Hôpitaux de Toulouse,
Diplômé de l'Institut d'Hydrologie, Lauréat de la Faculté.

Membres du Jury

MM.	VALDIGUIÉ	*Président*
	RIBAUT	*Assesseurs*
	MOOG	
	BRUSTIER	
	DELAS	*Suppléant*

POITIERS
SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'IMPRIMERIE ET DE LIBRAIRIE
6 et 8, rue Henri-Oudin, 6 et 8

1936

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN	MM. BARDIER.
ASSESSEUR	DAMBRIN.
Doyen honoraire	ABELOUS.
PROFESSEURS HONORAIRES	MM. MOSSE. SAINT-ANGE. BRÆMER. BEZY. MARIE. MOREL. TAPIE. AUDEBERT.

PROFESSEURS

Anatomie	MM. VALLOIS.
Histologie et Embryologie	ARGAUD.
Anatomie pathologique	TAPIE (J.).
Pathologie générale et expérimentale	BARDIER.
Bactériologie	RISPAL.
Pathologie interne	SERR.
Hygiène et Médecine préventive	LAFFORGUE.
Médecine légale	SOREL (E.).
Clinique médicale	DALOUS. LAPORTE
Clinique chirurgicale et gynécologie	MERIEL.
Clinique chirurgicale	DAMBRIN.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	CAUBET.
Clinique médicale infantile et puériculture	Mlle CONDAT.
Clinique de neurologie et psychiatrie	MM. RISER.
Clinique ophtalmologique	GORSE.
Physique biologique et médicale	ESCANDE.
Chimie et Toxicologie	MOOG
Pharmacie	RIBAUT.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	ROQUES.
Botanique et Matière médicale	MAURIN.
Clinique obstétricale	GARIPUY.
Physiologie	SOULA.
Clinique du cancer	DUCUING.
Cliniques des maladies des voies urinaires	MIGINIAC.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie topographique	MM. DIEULAFÉ.
Chimie	VALDIGUIÉ.
Anatomie	CLERMONT.
Histoire naturelle pharmaceutique	MARTIN-SANS.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	NANTA
Chimie générale pharmaceutique et toxicologique	BRUSTIER.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

COURS COMPLÉMENTAIRES

Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	MM. GARIPUY.
Obstétrique	ESTIENNY.
Chimie pathologique	VALDIGUIÉ.
Pharmacologie	SOULA.
Chimie minérale	VALDIGUIÉ.
Cryptogamie	MARTIN-SANS.
Zoologie	VALLOIS.
Stomatologie	CADENAT.
Physique pharmaceutique	BUGNARD.
Chimie organique	BRUSTIER.
Dermatologie et Syphiligraphie	CHATELLIER.
Législation pharmaceutique	MAURIN.
Botanique	MARTIN-SANS.
Parasitologie	DELAS.
Microbiologie	
Physiologie	BOUISSET.
Otorhinolaryngologie	CALVET.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

Histologie	MM. CALVET.
Médecine	SENDRAIL. SOREL (Raymond) MOREL L.
Chirurgie	LEFEBVRE. BOULARAN.
Pharmacie	FLORENCE.
Physique médicale	BUGNARD.
Obstétrique (chargé des fonctions d'Agrégé)	ESTIENNY.
Secrétaire de la Faculté	RENARD.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (Délibération en date du 12 mai 1891).

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. VALDIGUIÉ

Professeur de Chimie,
Pharmacien Chef des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur.

En témoignage de notre respectueux attachement et de notre bien vive reconnaissance pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée et les conseils éclairés qu'il n'a cessé de nous prodiguer aussi bien pendant notre internat à l'Hôpital qu'à la Faculté pendant nos années d'études.

A MON JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR RIBAUT

Professeur de Pharmacie
Chevalier de la Légion d'honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR MOOG

Professeur de Chimie et de Toxicologie
Chevalier de la Légion d'honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR BRUSTIER

Professeur de Chimie organique
Chevalier de la Légion d'honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ DELAS

Chargé du Cours de Microbiologie

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MAURIN

Professeur de Botanique et de Matière médicale

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MARTIN-SANS

Professeur de Botanique et de Cryptogamie

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ BUGNARD

Chargé du Cours de Physique médicale

A MONSIEUR LE DOCTEUR CAUJOLLE

Chargé des Conférences de Chimie alimentaire
Chef de travaux de Chimie

A TOUS MES MAITRES

de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

A MES MAITRES

de l'École préparatoire de Médecine et de Pharmacie de Poitiers

A MES MAITRES

de la Faculté des Sciences de Poitiers

INTRODUCTION

Si la gélatine a été bien étudiée tant dans les propriétés colloïdales de ses solutions que dans ses propriétés biologiques, peu de travaux ont été consacrés à l'étude de sa précipitation et de son dosage. Des recherches relativement récentes ont montré le rôle important que joue l'acidité du milieu dans la précipitation des protéines par les électrolytes ou les liquides organiques.

A notre connaissance ces recherches n'ont pas été étendues à la gélatine.

Nous avons essayé de fixer les conditions de sa précipitation par les désalbuminants usuels en fonction de la réaction du milieu afin d'appliquer le résultat de nos recherches à l'étude de son dosage.

Notre travail comprend quatre parties.

La première partie est le résumé des connaissances actuelles sur la gélatine, son origine, sa préparation, ses propriétés physiques et chimiques.

Les trois autres parties constituent notre contribution personnelle à son étude.

Dans la deuxième et la troisième partie, nous avons étudié l'action des principaux agents de précipitation des protéines (alcool, acétone, sulfate de soude, d'ammoniaque, de magnésie et acides métaphosphorique, trichloracétique, tungstique et phosphotungstique) sur la gélatine afin de fixer les conditions optima de leur emploi et d'établir le meilleur mode de dosage par précipitation.

Dans la dernière partie, nous avons appliqué les résultats acquis au dosage de la gélatine dans les préparations pharmaceutiques et à leur essai, ainsi qu'à la recherche et au dosage de la gélatine dans les substances alimentaires.

PLAN GÉNÉRAL

1re Partie. — Etude générale de la gélatine.

2e Partie. — Précipitation de la gélatine par les liquides neutres. Liquides organiques et solutions salines concentrées.

3e Partie. — Précipitation de la gélatine par les désalbuminants acides.

4e Partie. — Dosage de la gélatine dans les substances pharmaceutiques et alimentaires.

PREMIÈRE PARTIE

Etude générale de la Gélatine.

SOMMAIRE

CHAPITRE I. — Généralités. Collagènes et gélatines. Gélatines et colles animales.

CHAPITRE II. — Préparation de la gélatine.

CHAPITRE III. — Composition de la gélatine.

CHAPITRE IV. — Propriétés physico-chimiques des solutions de gélatine.

CHAPITRE V. — Gelées. Gonflement.

CHAPITRE VI. — Caractères chimiques de la gélatine et de ses solutions.

CHAPITRE PREMIER

Collagènes et gélatines. Gélatines et colles animales.

Collagènes et gélatines. — La gélatine est le produit que l'on obtient par l'action de l'eau chaude ou de sa vapeur sous pression sur divers tissus animaux : cartilages, tendons, os, rognures de peau, etc... C'est un produit de transformation des substances collagènes.

Les collagènes sont des substances protéiques insolubles dans l'eau et les solutions diluées de sels neutres ; ils gonflent mais ne se dissolvent pas dans les solutions alcalines ou acides étendues.

Traités par l'eau chaude sous pression, ou sous l'influence de l'ébullition prolongée et plus rapidement encore en présence d'acides ou d'alcalis, ils se transforment en produits solubles dans l'eau chaude susceptibles de se prendre en gelée par refroidissement (Vézien). C'est là leur caractère essentiel.

A cette famille des collagènes appartiennent l'osséine et la substance fondamentale du cartilage hyalin, qui sont les sources principales de la production de la gélatine. L'osséine est le constituant principal de la matière organique des os.

La substance fondamentale du cartilage hyalin est formée, d'après Arthus, d'une part de collagène, et d'autre part de la combinaison d'un acide azoté et sulfuré, l'acide sulfochondroïtique, avec des alcalis, du collagène et des substances albuminoïdes du groupe des mucines.

Par action de l'eau sur le cartilage hyalin, se dissolvent :

La gélatine formée,
Les sulfochondroïtates alcalins,
Le sulfochondroïtate de collagène,
Des substances protéiques non transformées,

l'ensemble constituant ce qui avait été considéré comme une substance unique, la chondrine.

Les fibres conjonctives sont essentiellement constituées par du collagène, elles contiennent en outre de l'élastine, substance qui n'est pas susceptible de fournir de la gélatine.

La transformation du collagène en gélatine a donné lieu à de nombreuses hypothèses. Hofmeister considère le collagène comme un anhydride de la gélatine.

D'après R. Bogue ; « le collagène serait plutôt un complexe polymérisé de la gélatine, la polymérisation étant comparable aux relations qui existent entre albumoses et peptones ». Autrement dit, la gélatine résulterait non pas d'une simple fixation d'eau sans dédoublement concomitant, mais d'une dislocation de la molécule protéique.

Gélatines et colles animales. — Si on considère la gélatine comme le produit de transformation du collagène par l'action de l'eau chaude, on comprendra sous le terme de gélatine toutes les colles animales. On a coutume aujourd'hui de désigner sous le nom de colles, les produits les plus grossiers et on réserve le nom de gélatine aux produits les plus purs qui sont réservés aux usages alimentaires et pharmaceutiques (Cambon).

Ces deux sortes de produits diffèrent par la qualité des matières premières employées dans la préparation et par les traitements que l'on fait subir à ces matières premières.

Nous n'étudierons ici que la gélatine destinée aux usages alimentaires ou pharmaceutiques.

CHAPITRE II

Préparation de la gélatine.

1° Matières premières. 2° Traitement préliminaire des matières premières. 3° Préparation des bouillons gélatineux. 4° Traitement des bouillons. 5° Purification de la gélatine obtenue.

1° **Matières premières.** — Les matières premières utilisées dans cette industrie sont les os, les peaux et résidus de tanneries.

A) Les os. — La gélatine de bonne qualité est essentiellement préparée à partir des os. Papin le premier a extrait la gélatine des os dans le but d'obtenir une substance nutritive et, depuis, cette industrie s'est sans cesse développée et perfectionnée, car si la gélatine a une valeur nutritive bien faible (Pégou) elle a par contre trouvé de nombreuses utilisations dans les industries alimentaires et pharmaceutiques et en photographie.

Les os employés dans cette industrie sont d'origines diverses :

a) Les os de cuisine et de boucherie constituent une matière première facile à trouver, mais ils présentent l'inconvénient d'être d'un nettoyage long et pénible ;

b) Les os de tabletteries sont constitués par le résidu de la fabrication des objets en os. Ils sont très recherchés pour la fabrication des gélatines très pures mais ne peuvent constituer qu'une source très faible de matières premières ;

c) Les os des Indes proviennent d'animaux sacrifiés pour la production des peaux, dont les carcasses abandonnées

au soleil blanchissent spontanément. Ces os arrivent en Europe après concassage et tamisage sur place.

B) Les peaux et résidus de tannerie. — On prépare également la gélatine à partir des peaux, des cartilages, des résidus de tanneries, des cornillons, etc...

La fabrication de la gélatine à partir des peaux est très ancienne, puisque déjà elle était connue des Romains. Mais aujourd'hui, la tannerie absorbant la presque totalité des peaux, il ne reste pour la fabrication de la gélatine, que les déchets de tannerie : oreilles, cornillons, etc..., dits rognures de peaux.

La qualité du produit obtenu dépend de la matière première employée.

D'une façon générale la peau des jeunes animaux est beaucoup plus estimée que celle des adultes. Les matières premières venant de veaux ou de génisses fournissent un produit de qualité supérieure ; ainsi la grénétine, du nom de Grenet, fabricant à Rouen, dont le nom est aujourd'hui adopté par le Codex pour désigner la gélatine officinale, était obtenue à partir des cartilages osseux de veaux et de jeunes animaux.

Toutes ces substances : os, peaux, résidus divers, sont couramment désignées dans l'industrie sous le nom de colles-matières.

2° **Traitement préliminaire des matières premières.** — Avant la coction qui les transformera en bouillon gélatineux, les colles-matières doivent être soumises à un traitement préparatoire destiné à faciliter la transformation du collagène des colles-matières en gélatine et à permettre l'obtention rapide d'un bouillon gélatineux à peu près pur.

Ce traitement préparatoire varie suivant qu'il s'agit d'os ou de peaux.

A) Les os. — Le traitement des os à l'eau chaude sous pression tel qu'il fut pratiqué par Papin ne produit que des colles grossières. Pour obtenir de beaux produits on extrait

d'abord l'osséine de l'os, puis on transforme l'osséine en gélatine.

Les os nettoyés et lavés sont mis dans un bain d'acide chlorhydrique de titre déterminé, de 3°5 à 5° Baumé en général, à une température maintenue au-dessous de 20°. Lorsque la dissolution de la matière minérale est complète, l'osséine reste un peu rugueuse au toucher, mais elle est devenue souple à la pression. Pour la dissolution de la matière minérale, certaines usines emploient maintenant l'acide sulfureux, qui présente l'avantage d'une attaque moins brutale respectant mieux les qualités de l'osséine et, de plus, le pouvoir décolorant de SO^2 donne naissance à des produits d'aspect plus flatteur. L'osséine ainsi obtenue est lavée à grande eau pour la débarrasser de l'acide. On peut alors la sécher et interrompre à ce moment le traitement. Si la dessiccation est complète, on peut conserver l'osséine ainsi préparée pendant plusieurs mois, elle se prête bien aux échanges et aux transports. A partir de ce point le traitement que doit subir l'osséine est absolument identique à celui que doivent subir les peaux.

B) Les peaux et osséines. — Le premier traitement à faire subir aux peaux et osséines est le trempage dans un lait de chaux.

Le chaulage a pour effet de :

Gonfler les matières sèches ;

Détruire sang et lymphe ;

Saponifier les graisses.

En outre, ce traitement blanchit les matières et contribue à rendre les gélatines incolores. Le gonflement préalable de la colle-matière rend la dissolution plus facile.

Après le chaulage, les substances sont lavées à l'eau et passées dans un bain acide pour enlever les traces de chaux. On emploie de préférence pour ces bains l'acide phosphorique à 1 %, après un dernier lavage à froid la colle-matière est prête à être livrée à la cuve où elle sera fondue.

3° **Préparation des bouillons gélatineux.** — La transformation de la colle-matière en gélatine se fait en général dans une cuve en bois de pitchpin chauffée par un serpentin de vapeur et disposée de façon à obtenir du premier coup et rapidement la plus grande partie de la gélatine à l'état de premier bouillon, toujours de valeur supérieure aux suivants.

Les colles-matières étant disposées dans la cuve, on les arrose avec de l'eau chaude et on introduit la vapeur dans le serpentin. On homogénise la masse. La température à répartir dans la masse varie avec la nature de la matière première. On ne dépasse guère 65° pour des peaux de jeunes animaux, avec des produits venant d'animaux plus âgés il faut atteindre 85°. De temps en temps on détermine avec un gélatinomètre le titre du bouillon. Le gélatinomètre est un aréomètre volumineux dont l'ampoule contient un thermomètre. Cet appareil est construit et gradué de telle façon que plongé dans un bouillon pris à une température quelconque, il donne immédiatement la richesse du bouillon en fonction du degré indiqué et de la température. Quand le bouillon est arrivé au titre voulu, on ouvre le robinet à la partie inférieure et on dirige le liquide dans un réservoir. Le titre à obtenir est variable, il dépend de la qualité recherchée. Si on arrête l'opération au moment où le gélatinomètre marque 10%, la gélatine sera plus belle que si l'on attend un titre de 15 %, mais d'autre part il y a un gros avantage à obtenir le maximum de gélatine dans le premier bouillon, les bouillons suivants donnant toujours des produits de qualité bien inférieure.

Le bouillon ainsi obtenu est clarifié s'il y a lieu par des agents divers : albumine, permanganate, solution sulfureuse, eau oxygénée ; le plus souvent on ajoute au bouillon un peu de solution sulfureuse qui sert à la fois d'antiseptique et de décolorant.

4° **Traitement des bouillons.** — Les bouillons ainsi obtenus ne sont pas concentrés comme dans la préparation des

colles d'os, car la concentration altère la qualité des produits. Les bouillons sont coulés directement dans des moules à gélatiniser. Aussitôt la gelée prise, le pain de gélatine est détaché et envoyé au découpage en plaques.

Les plaques de gelées sont disposées sur des cadres à filets de cordes ou de fils métalliques, et ces filets sont disposés en piles, dans des séchoirs ; on sèche les plaques de gelée par un courant d'air sec et froid pour éviter la fusion des plaques et pour réduire au minimum l'altération du produit.

5° **Purification de la gélatine obtenue.** — La gélatine ainsi obtenue est encore riche en matières minérales. Pour la purifier il faut dialyser pendant plusieurs jours dans l'eau froide. On élimine ainsi les substances solubles, on redissout le produit dans l'eau chaude et le bouillon est traité comme précédemment.

Pour avoir une gélatine plus pure on précipite sa solution par l'alcool, le précipité est essoré ; on le redissout dans l'eau pour éliminer l'alcool et on évapore comme précédemment. La gélatine ainsi obtenue se présente en plaques. Le commerce livre parfois des gélatines en grains et des gélatines en poudre.

CHAPITRE III

Composition de la gélatine.

1° Composition centésimale. 2° Acides aminés constituants. 3° Réactions colorées.

1° **Composition centésimale.** — Pour fixer de façon exacte la composition de la gélatine il a fallu l'obtenir pure et bien déminéralisée, et vraisemblablement la difficulté de purification fut, en partie du moins, l'origine des différences de composition trouvées par les divers auteurs. Ainsi les chiffres trouvés pour la teneur en azote oscillent de 18,81 % (Von Name, 1897) à 17,68 % (Faust, 1898). Pour le soufre on a trouvé des chiffres compris entre 0,14 (Perret) et 0,74 (Hammarsten).

Dans le *Handbuch der Physiologish und Pathologish chemischen* de Hoppe-Seyler und Thierfelder, on trouve les chiffres suivants représentant les résultats de diverses analyses :

	C	H	N	S	Cendres
Von Name	50,06	6,56	17,86	0,277	0,346
Sadikoff	54,27	6,85	18,25	0,48	0,21
Faust	49,09	6,76	17,68	0,48	0,42
Poal	50,09	6,68	18,12	0,57	0,07

Dhéré et Gorgolewski ont dosé N et S dans des gélatines bien déminéralisées par dialyse prolongée dont la purification était achevée par congélation ou par dialyse électrique de façon à obtenir des gélatines bien débarrassées de matières minérales et de produits d'hydrolyse.

Ils ont trouvé un léger écart entre deux gélatines d'origine différente.

Pour l'azote :

Gélatine Coignet : 18,05 %.
Grübler : 18,10 %.

Pour le soufre, les deux chiffres trouvés pour ces gélatines sont identiques et représentent une teneur de 0,237 %.

Ces différences de composition font penser qu'il y a différents collagènes, comme l'écrit Hoppe Seyler. Lebeau donne comme composition moyenne de la gélatine pure officinale :

C	49 à 50 %
H	6,4 à 6,7
N	17,8 à 17,9
S	0,2 à 0,7
O	24 à 25

2° **Acides aminés constituants.** — Comme toutes les protéines, la gélatine est constituée par un assemblage d'acides aminés, mais tous les acides aminés constituant habituellement les protéines ne s'y trouvent pas. Ainsi on ne trouve ni tyrosine ni tryptophane, ce qui entraîne la faiblesse de sa valeur nutritive (Pégou, Porcher et Jung). Par contre on y trouve du glycocolle en quantité importante, 16,5 % d'après Perret et Levène, 25,5 % d'après les analyses de Dakin. Les analyses, les plus complètes des produits d'hydrolyse qui ont été faites par Dakin, ont conduit aux résultats suivants :

NH_3	0,4
Glycine	25,5
Alanine	8,7
Leucine	7,1
Phénylalanine	1,4
Tyrosine	0,01
Sérine	0,4
Proline	9,5
Oxyproline	14,1
Acide aspartique	3,4
Acide glutamique	5,8
Arginine	8,2
Lysine	5,9
Histidine	0,9

Les chiffres de Dakin attirent l'attention par plusieurs points :

Par le taux élevé de glycocolle qui est de 25,5 % alors que les autres chimistes avaient trouvé 16,5 % ;

Par la présence de tyrosine à l'état de traces alors que la plupart des chimistes en avaient constaté l'absence ;

L'absence d'acides aminés contenant du soufre, bien que l'analyse des gélatines les plus pures en décèle des quantités notables. Aucun chimiste d'ailleurs ne dit sous quel état ou dans quelle combinaison est le soufre contenu dans la gélatine. Sans doute a-t-il son origine dans les acides chondroïtino-sulfuriques constituant les cartilages. Nous ne savons pas sous quel état ce soufre passe dans la gélatine.

3° **Réactions colorées.** — L'absence de certains acides aminés et en particulier l'absence d'acides aminés à fonction phénol fait que la gélatine ne donne pas toutes les réactions colorées des matières protéiques.

Ainsi la réaction de Millon est négative en raison même de l'absence de fonction phénol. La réaction glyoxylique due au tryptophane est également négative.

La réaction du biuret due à la présence de liaisons peptidiques CO-NH est positive. La réaction xanthoprotéique due à la présence de noyaux benzéniques est également positive.

CHAPITRE IV

Propriétés physico-chimiques des solutions de gélatine.

1° Nature colloïdale. 2° Constitution des solutions. 3° Caractère amphotère. 4° Point isoélectrique. 5° Viscosité des solutions. 6° Pouvoir protecteur.

1° **Nature colloïdale.** — Si on met de la gélatine dans de l'eau chaude, elle gonfle et se dissout. La solution ainsi obtenue ne dialyse pas à travers les membranes semi-perméables comme le font les solutions de cristalloïdes et, par évaporation, elle ne donne pas de résidu cristallisé.

La gélatine appartient comme toutes les protéines au groupe des colloïdes dits hydrophiles par opposition aux colloïdes hydrophobes appelés aussi suspensoïdes. Ces deux catégories de colloïdes se différencient essentiellement par la stabilité de leur solution en présence d'électrolytes. De faibles traces d'électrolytes sans action sur les premiers suffisent à précipiter les seconds. La solution de gélatine est constituée par une suspension d'agrégats moléculaires appelés micelles dans un liquide intermicellaire, différent du solvant pur. « La micelle est au colloïde ce que la molécule est au cristalloïde. » (Duclaux.)

La micelle de gélatine, beaucoup plus grosse que la particule cristalloïde, échappe cependant à l'examen ultra-microscopique, contrairement à la plupart des micelles colloïdales.

L'effet Tyndall peut être observé sur cette solution, mais il est toujours très peu marqué.

2° **Constitution de la solution.** — L'étude de la constitution de ces solutions a donné lieu à de nombreux travaux.

On a considéré ces solutions comme un système à deux phases : une phase dispersée constituée par les micelles en solution et une phase liquide constituée par le liquide intermicellaire.

La stabilité de la suspension serait assurée par l'existence de doubles couches électriques à la surface des micelles. Cette théorie électrostatique de la stabilité applicable aux suspensions de colloïdes hydrophobes s'est montrée en défaut pour les solutions de protéines.

Pour Lœb, les forces maintenant en solution les colloïdes protéiques sont analogues aux forces maintenant en solution les substances cristalloïdes. Ce sont des forces d'attraction de nature chimique entre l'eau et la substance dissoute.

Dans les molécules protéiques, il existe des groupes aminés NH^2 et des groupes carboxylés COOH qui ont pour l'eau une grande affinité et que Lœb qualifie d'hydrophiles, et d'autres groupes ayant peu d'affinité pour l'eau et une grande affinité réciproque qui sont qualifiés par Lœb « d'éléiques » (1). Ces derniers groupes ne sont pas capables de surmonter les forces par lesquelles les groupes hydrophiles tiennent la molécule en liaison avec l'eau, mais ils peuvent donner naissance à une chaîne ou à un réseau en se liant aux groupes correspondants des molécules voisines.

3° **Caractère amphotère.** — La gélatine est un électrolyte amphotère, c'est-à-dire qu'elle peut se combiner aux bases pour donner des gélatinates et aux acides pour donner des sels de gélatine.

La micelle de gélatine est constituée par un noyau qu'on appelle le granule, et par des groupements libérables sous forme d'ions entourant le noyau, et susceptibles de se combiner aux ions acides ou alcalins.

(1) Pour l'emploi de ce mot, voir Lœb : *Les Protéines*, traduit par Mouton, page 23, note du traducteur.

En faisant passer un courant électrique dans une solution alcaline de gélatine, sodique par exemple, on observe que l'ion alcalin Na^+ se dirige vers la cathode, tandis que le radical complexe de la micelle se dirige vers l'anode. La micelle de gélatine en solution alcaline a libéré des ions H^+ qui se sont unis aux ions OH^- de l'alcali. La granule a ainsi acquis une charge négative, c'est pourquoi il se dirige vers l'anode.

A la solution alcaline ajoutons progressivement de l'acide. Faisons passer un courant électrique dans la solution, la partie visible de la micelle de gélatine se dirige d'abord vers l'anode puis en continuant l'addition d'acide on change la direction de la gélatine, on voit bientôt le radical complexe de la gélatine se diriger vers la cathode. En milieu acide, la gélatine libère des ions OH^- qui se combinent aux ions H^+ de l'acide.

Le granule acquiert ainsi une charge positive et c'est pourquoi il se dirige vers la cathode.

4° **Point isoélectrique.** — Par addition d'acide le granule d'abord chargé négativement a acquis une charge positive. Pour une certaine acidité la charge du granule doit donc s'annuler : c'est le point isoélectrique.

L'existence de ce point a été mise en évidence par Hardy en 1899, en faisant mouvoir du blanc d'œuf coagulé dans un champ électrique. Ce point a été déterminé pour la plupart des protéines. Pour la gélatine, il correspond à une concentration en ions H^+ de $2{,}10^{-5}$, soit pH 4,7. Certains auteurs disent pH 4,6.

Quand la concentration en ions H^+ est inférieure à $2{,}10^{-5}$, il y a libération d'ion H^+, le granule est chargé négativement :

Les solutions de $C_H < 2{,}10^{-5}$ contiennent des gélatinates, dans cette zone d'acidité la gélatine fixe des cations.

Si la concentration en ions H^+ devient plus grande, il y a libération d'ions OH^-, le granule acquiert une charge positive et les solutions de $C_H > 2{,}10^{-5}$ contiennent des sels de

gélatine. Dans cette zone la gélatine fixe des anions. C'est ce que vérifient les expériences faites par Lœb avec le nitrate d'argent, le sulfocyanure de potassium et les colorants.

De cette dissociation de la gélatine il résulte que si, à de la gélatine isoélectrique, on ajoute de l'alcali ou de l'acide, une partie de la gélatine est transformée en sel et cela en proportion d'autant plus forte que l'on a ajouté plus d'acide ou d'alcali ; il se forme dans chaque cas un équilibre entre la gélatine isoélectrique, non dissociée, et le sel de gélatine, « équilibre caractérisé par une concentration en ions H^+ déterminée », dit Meunier.

On peut représenter schématiquement le radical complexe de la gélatine par

$$\left[R \begin{matrix} \diagup COO \\ \diagdown NH^2 \end{matrix} \right]^-$$

pour un granule chargé négativement et par

$$\left[R \begin{matrix} \diagup COOH \\ \diagdown NH^2_H \end{matrix} \right]^+$$

pour un granule chargé positivement.

5° **Viscosité**. — Les solutions de gélatine présentent une viscosité élevée. Cette viscosité varie avec le pH de la solution, elle est minimum au point isoélectrique. Si à une solution de gélatine isoélectrique on ajoute progressivement de l'acide ou de l'alcali, la viscosité est d'abord augmentée, elle passe par un maximum puis diminue ensuite ; l'addition de sels neutres diminue la viscosité des solutions.

6° **Pouvoir protecteur**. — « La finesse de la phase dispersée des solutions de gélatine, laisse prévoir une action très active comme colloïde protecteur », dit Meunier.

Lorsqu'on ajoute une solution de colloïde hydrophile à une suspension colloïdade, on remarque souvent que la suspension la moins stable devient plus stable. Ainsi, il suffit

d'un peu de NaCl pour faire floculer une suspension colloïdale d'or. Si on ajoute préalablement à la suspension un peu de gélatine, on lui fait perdre sa sensibilité vis-à-vis des électrolytes. On attribue à la formation d'une pellicule de colloïde protecteur autour des particules d'or ce pouvoir retardateur vis-à-vis de la précipitation. Les grosses particules n'exercent qu'un pouvoir protecteur très faible. Les colloïdes très dispersés sont les plus actifs.

Zsigmondy a défini ce pouvoir protecteur par le nombre de milligrammes de colloïde protecteur qui suffit à empêcher le virage du rouge au bleu de 10 cc. d'un hydrosol d'or par addition de 1 cc. de NaCl à 10 %. C'est l'indice d'or. Pour la gélatine ce pouvoir protecteur est très élevé, l'indice d'or est très faible, il est compris entre 0,005 et 0,01. C'est le colloïde protecteur le plus actif. On l'emploie en raison de cela dans les manufactures de crèmes glacées pour éviter la formation de gros cristaux de glace et obtenir de l'onctuosité. Sa présence dans le lait empêche la formation de caillots granuleux quand le lait est acidulé.

CHAPITRE V

Gelées. Gonflement.

1° Prise en gelée. 2° Constitution des gelées. 3° Gonflement de la gélatine. 4° Action de l'acidité et de l'alcalinité du milieu sur ce gonflement. 5° Action des solutions salines. 6° Explication du gonflement.

1° **Prise en gelée.** — En laissant refroidir une solution aqueuse de gélatine elle se prend en une masse solide élastique, transparente, qui occupe la totalité du volume de la solution. Il suffit que la solution contienne 1 % de gélatine pour que cette prise en gelée ait lieu. Une solution plus concentrée se prend en gelée plus rapidement en donnant une gelée plus consistante.

Dastre et Floresco ont mesuré les différences de prise en gelée avec des solutions laissées quelque temps à l'étuve à 40° puis abandonnées à 22° (Perret).

Pour la solution	1 %	la prise en gelée a demandé	60	minutes
—	2,50 %	—	45	—
—	5 %	—	25	—

Une solution de gélatine soumise à une ébullition prolongée ou maintenue pendant une demi-heure à 115° ou 5 minutes à 130° perd la propriété de se prendre en gelée par refroidissement ; la gélatine éprouve par action de l'eau à haute température une modification qui se traduit soit par la diminution, soit par la perte totale de la faculté de gélification.

Cette gélification est variable avec la constitution même des gélatines employées ; la richesse en cendres, la quantité

et la nature des impuretés peuvent agir sur ce pouvoir de gélification. La présence de certains corps augmente la solubilité de la gélatine et diminue la vitesse de gélification. Ainsi la gélatine est soluble à froid dans les solutions moyennement concentrées de salicylate de soude et elle ne s'y solidifie pas à température ordinaire. Lévités, Pauli et Rona ont montré que les corps qui ralentissent la gélification abaissent la température de prise en gelée, tandis que ceux qui l'accélèrent élèvent le point de fusion de la gelée. D'après Pauli, l'alcool abaisse le point de gélification. Il en est de même de l'urée, des chlorures, bromures et iodures, des sels de Ca (Vézien). Ces substances retardent la prise en gelée. Au contraire le glucose, la glycérine, les sulfates, les acétates alcalins, élèvent le point de gélification et favorisent la prise en gelée.

2° **Constitution des gelées.** — Lœb oppose la prise en gelée à la précipitation. Dans la précipitation, les groupes hydrophiles perdent leur affinité pour l'eau et la protéine se sépare ; dans la prise en gelée l'affinité de ces groupes pour l'eau n'est pas modifiée, il y a un changement dans l'orientation des molécules qui les amène à se toucher et à se lier par leurs groupes « éléiques ».

La constitution des gelées ainsi obtenues a été très étudiée et très discutée, et de nombreuses hypothèses ont été formulées.

On admet aujourd'hui qu'une gelée de gélatine est constituée par une phase solide, solution d'eau dans la gélatine, disposée en réseau et enserrant dans ses mailles la phase liquide : solution de gélatine dans l'eau.

3° **Gonflement de la gélatine.** — La gélatine plongée dans l'eau froide gonfle en absorbant de l'eau, sans se dissoudre sensiblement. Le poids d'eau absorbé par un poids donné de gélatine mesure ce gonflement. Pour le déterminer on tare par exemple un petit carré de gélatine en plaques, on l'immerge un temps donné et on le pèse après l'avoir soigneusement séché entre deux feuilles de papier buvard. Ce gonfle-

ment est variable dans sa vitesse, dans sa limite, et dans la vitesse avec laquelle il atteint la limite. Il est d'autant plus grand que la température est plus élevée, mais au-dessus de 34° la gélatine gonflée fond, on ne peut donc parler de gonflement au-dessus de cette température.

Dhéré en étudiant le gonflement de la gélatine déminéralisée dans l'eau distillée a formulé les conclusions suivantes :

« En faisant gonfler la gélatine dans l'eau pendant une heure, on constate que la quantité d'eau absorbée est d'autant moindre que la température est plus basse, mais le degré de gonflement ainsi atteint est d'autant plus voisin de l'état final à la température considérée que le gonflement se produit à une température plus basse. »

Le gonflement de la gélatine dans l'eau est très sensible à la présence d'électrolytes et son étude en présence d'acides, de bases ou de sels a donné lieu à de nombreux travaux.

4° **Action de l'acidité ou de l'alcalité du milieu sur le gonflement.** — Cette action a été étudiée par Procter, Llyold, Lœb. La conclusion apportée par Meunier à tous ces travaux est la suivante :

« Si on soumet au gonflement pendant 48 heures par exemple, une gélatine prise à $C_H < 2{,}10^{-5}$, dans des solutions d'acidité croissante, et si l'on détermine pour chaque essai le gonflement par le poids d'eau absorbé on constate que ce gonflement diminue d'abord jusqu'à ce que la valeur du pH dans la gélatine atteigne la valeur correspondant au point isoélectrique puis augmente brusquement et atteint un maximum dans la zone des acides-gélatines. A ce moment le pH de la gélatine est égal à 3 et celui de la liqueur acide à 2,4. Quel que soit l'acide employé, la quantité maxima d'eau absorbée a toujours lieu pour le même pH, mais la grandeur de ce maximum dépend de la nature de l'acide. Ce ci montre qu'au point isoélectrique le gonflement est minimum.

5° **Action des solutions salines.** — La présence de sel en

solution augmente le gonflement, il y a une concentration optima variable pour chaque sel. Ainsi pour le sulfate de soude, le gonflement maximum est obtenu avec une solution à 5 pour 300 ; pour le sulfate d'ammoniaque c'est la concentration 10 pour 300 et pour le citrate de soude 2,5 pour 300.

6° **Explication du gonflement.** — Cette action des électrolytes a été très étudiée et très discutée. On a cherché à classer les ions d'après leur activité sur le gonflement: série d'ions d'Hofmeister.

Certains ont attribué à la valence des ions une action prépondérante. On admet aujourd'hui que ce gonflement est dû à des forces résultant des différences de pression osmotique entre la gélatine gonflée et le liquide qui la baigne.

Les expériences de Moraczewski et St. Grzycki d'une part et de Bigwood et Majmin d'autre part, sur les échanges d'électrolytes entre une gelée de gélatine et le liquide qui la baigne ont montré qu'il se produit entre la gelée et le liquide extérieur, un échange d'ions aboutissant à un équilibre osmotique : l'équilibre de Donnan. De cet équilibre résulte une différence de pression osmotique entre la gelée et le liquide. Cette différence de pression osmotique est la force qui détermine le gonflement. Elle est limitée par une force antagoniste : l'élasticité du réseau, il y a équilibre quand ces deux forces sont équivalentes.

CHAPITRE VI

Caractères chimiques de la gélatine et de ses solutions.

1° Action des acides et des alcalis. 2° Action des sels alcalins en solutions étendues. 3° Digestion saline. 4° Action des sels alcalins en solutions concentrées. 5° Action des sels de métaux lourds. 6° Action des substances organiques, alcool, acétone, formol, tanin, acide picrique et substances à fonction phénol. 7° Insolubilisation de la gélatine. 8° Tannage de la gélatine : *a*) par les halogènes, *b*) par les sels minéraux, *c*) par les substances organiques.

1° **Action des acides et des alcalis.** — La gélatine est soluble dans les acides. Les acides usuels ne la précipitent pas de ses solutions, mais les acides trichloracétique, métaphosphorique, tungstique, phosphotungstique la précipitent. La gélatine est également soluble dans les alcalis, et les solutions de gélatine possèdent la propriété de dissoudre les bases alcalino-terreuses en quantités notables.

Les solutions acides de gélatine sont des solutions de sels de gélatine et les solutions alcalines sont des solutions de gélatinates. Il n'y a pas identité absolue entre ces deux sortes de sels, comme l'a montré Meunier par l'expérience suivante :

Si on met 2 grammes de gélatine dans 200 cc. d'HCl N/10 à la température ordinaire, on constate qu'au bout d'une semaine la dissolution est complète sous forme de chlorure de gélatine.

De même si on met en présence 0 gr. 20 de gélatine avec 200 cc. de NaOH N/10 à la température ordinaire, la dissolution est complète après deux jours, et on obtient ainsi une solution de gélatinate de soude.

Si on neutralise exactement les deux solutions, la première par 20 cc. de soude N, la seconde par 20 cc. d'HCl N et qu'on ajoute un excès de sulfate d'ammoniaque, les deux précipités obtenus sont différents. En recueillant sur un filtre on constate que le précipité régénéré de la solution de chlorure de gélatine peut être lavé à l'eau froide sans se dissoudre, il est ensuite soluble dans l'eau chaude et la solution chaude se prend en gelée par refroidissement. C'est donc un précipité de gélatine normale ; ce qui nous permet de dire que la réaction de formation du chlorure de gélatine est réversible.

On peut écrire :

Gélatine + HCl = Chlorure de gélatine.
Chlorure de gélatine + NaOH = Gélatine + NaCl.

Si on examine au contraire le précipité régénéré de la solution de gélatinate de soude, on constate qu'il est soluble dans l'eau froide et la solution concentrée à chaud ne se prend pas en gelée par refroidissement. La réaction de formation du gélatinate de soude n'est donc pas réversible et l'on a :

Gélatine + Soude = Gélatinate de soude.

Mais la réaction

Gélatinate de soude + HCl = Gélatine + NaCl

ne se fait pas exactement.

Il semble bien que cette fixation s'effectue sur de nombreux groupements CO-NH qui existent aux points de soudure des acides aminés constitutifs de la molécule protéique, l'hydrogène du résidu basique NH pouvant acquérir des propriétés acides par suite du voisinage des groupements CO.

On peut admettre, dit Meunier, que sous l'action des acides les groupements de soudure prennent la forme cétonique CO-NH tandis que sous l'action des bases ils prennent la forme œnolique.

$$-\underset{\text{OH}}{\text{C}}=\text{N}-$$

On aurait ainsi l'explication de la différence observée dans les produits précipités par le sulfate d'ammoniaque dans ces deux sortes de sels.

2° **Action des sels alcalins en solutions étendues.** — La gélatine peu soluble dans l'eau distillée est plus soluble dans les solutions salines étendues. Si on fait dissoudre à chaud dans de l'eau distillée de la gélatine isoélectrique bien déminéralisée de façon à obtenir une solution de 1 à 2%, on obtient par refroidissement une gelée opaque indice d'une mauvaise solubilité. Lœb a préparé des solutions de gélatine à 0,1 %, 0,2 % jusqu'à 1 % et il les a laissées au repos dans des tubes à essais à une température suffisamment basse. Seul, le tube contenant 0 gr. 1 % reste clair, les autres deviennent troubles et opaques et d'autant plus que la concentration de la gélatine est plus élevée. Lœb a pu utiliser ces solutions comme échelle de nébulosité. Avec les solutions salines les gelées ainsi obtenues sont transparentes.

En faisant dissoudre la gélatine dans des solutions salines étendues, on a pu étudier l'action dissolvante des différents sels. Les sels alcalins et alcalino-terreux exercent sur la gélatine une action dissolvante manifeste variable avec la nature du sel. A concentration égale, dit Meunier, les sels de métaux bivalents exercent une action plus marquée que les sels de métaux monovalents et pour un même métal les nitrates exercent une action plus marquée que les chlorures.

3° **Digestion saline.** — La digestion saline de la gélatine a été découverte par Dastre et Floresco. La gélatine conservée avec des solutions salines se gélifie à température ordinaire et reste ainsi indéfiniment. Quand on la porte à l'autoclave à 120° la présence de sels ne change pas les conditions d'altérations. Au contraire, maintenues à l'étuve à 40° pendant plusieurs jours, les solutions salines de gélatine ne se prennent plus en gelées et la gélatine a acquis les caractères des progélatoses définies par les caractères suivants :

Absence de la faculté de gélification ;

Absence de précipitation par NaCl à saturation.

Si la proportion de sel est assez élevée, 10 % par exemple, la liquéfaction est définitive. Si le sel est à une concentration plus faible, 1 % par exemple, il y a simplement retard de la gélification et diminution de consistance de la gelée.

Stiasny explique cette désagrégation ainsi :

Dans la gélatine il faut considérer deux sortes de liaisons, les primaires entre acides aminés pour constituer des polypeptides et les secondaires entre polypeptides pour constituer la gélatine. Les sels neutres ayant la propriété de défaire ces derniers liens peptonisent la gélatine mais n'hydrolysent pas les polypeptides et n'aboutissent pas comme les digestions pepsiques ou pancréatiques à des acides aminés cristallisables.

4° **Action des sels alcalins en solutions concentrées.** — Les solutions de sels alcalins très solubles dans l'eau comme les carbonates alcalins, l'hyposulfite de soude, les chlorures de sodium, de potassium, de magnésium, les sulfates de soude, d'ammoniaque, de magnésie donnent des précipités avec les solutions de gélatine. Ces précipités peuvent être facilement séparés et lavés. « Il s'agit d'un gel déshydraté par l'action osmotique puissante de la solution saline concentrée (Lœb). »

Pour Lœb l'action des groupes hydrophiles maintenant les protéines en solution se trouve supprimée et il y a floculation en raison de la prépondérance de la force d'attraction des groupements éléiques.

5° **Action des sels de métaux lourds.** — En présence de potasse ou de soude la gélatine donne des réactions particulières avec les sels de Hg, Ag. En solution alcaline $HgCl^2$ est réduit à l'état de Hg, de même la gélatine donne avec le réactif de Nessler, un précipité gris de Hg métallique, dont l'apparition n'est pas immédiate mais se fait petit à petit (Vamvakas). NO^3Ag en solution alcaline est réduit à l'état de Ag.

D'autre part, un grand nombre de sels de métaux lourds précipitent la gélatine de ses solutions, $HgCl^2$ en solution chlorhydrique donne avec la gélatine un précipité soluble dans l'eau chaude. Le sulfate de zinc à saturation (Grienfagen), $HgI^4\ K^2$ en solution acétique (réactif de Tanret) précipitent la gélatine de ses solutions. Le ferrocyanure acétique précipite également la gélatine, mais à condition toutefois que la solution ne soit pas trop concentrée, trop chaude ou trop riche en sel (Hoppe-Seyler).

Les sels ferriques à l'exception des citrates et tartrates, les sels vanadiques, cériques, uraniques, platiniques, auriques, précipitent la gélatine de ses solutions en donnant des précipités insolubles dans l'eau chaude, contrairement à ceux qui sont obtenus avec les sels alcalins et les sels mercuriques.

Les précipités ainsi obtenus retiennent toujours de la substance minérale, même après un lavage prolongé. Le précipité obtenu avec $FeCl^3$, étudié après lavage et dessiccation, répond aux caractères suivants : précipité brun rouge insoluble dans l'eau chaude, contenant 16,3 % d'azote et 6,45 % de substance minérale.

Avec le nitrate d'urane on a un précipité jaune clair contenant 16,1 % d'azote et 6,4 % de substances minérales.

Les sels d'alumine augmentent la viscosité de la solution de gélatine sans produire de précipité apparent.

Le permanganate de potassium en solution concentrée agit comme le perchlorure de fer ; il donne avec une solution de gélatine un précipité qui, après lavage, retient des matières minérales et qui est insoluble dans l'eau chaude.

En étudiant la précipitation de la gélatine par les métaux lourds, Lumière et Seyewetz ont fait la remarque suivante :

« Tous les composés minéraux qui en solution peu concentrée précipitent la gélatine sont des oxydants. »

La réciproque n'est pas exacte, la précipitation de la gélatine n'est pas une propriété commune à tous les oxydants minéraux. Cependant la gélatine est encore précipitée par l'eau de chlore et l'eau de brome en donnant des précipités insolubles dans l'eau bouillante.

6° **Action des substances organiques.** — *Alcool.* — La gélatine est insoluble dans l'alcool et l'alcool précipite les solutions de gélatine, mais la liqueur précipitante doit être neutre et le titre final doit être d'au moins 70°, dit Perret.

Pour de faibles teneurs en alcool, il n'y a pas précipitation, il y a retard à la prise en gelée.

Acétone. — L'acétone agit comme l'alcool, mais la précipitation exige un titre final moins élevé.

Les précipités fournis par ces deux liquides sont facilement solubles dans l'eau chaude, ils se redissolvent même par simple dilution de la solution d'où ils sont précipités.

Le formol. — Le formol, très souvent employé pour précipiter les protéines (Mascré et Bouchara), ne précipite pas la gélatine de ses solutions. Il amène la prise en gelée de la solution sans provoquer la séparation de la gélatine.

La gelée ainsi obtenue est insoluble dans l'eau chaude et donne par évaporation un résidu corné très dur.

En dehors de ces corps, il existe un grand nombre de substances organiques susceptibles de précipiter la gélatine de ses solutions, surtout parmi les substances à fonction phénol.

Le tanin. — Le tanin est un réactif bien connu des protéines et c'est un réactif de la gélatine couramment employé. Il donne avec la gélatine un précipité insoluble dans l'eau chaude.

Le tanin étant acide faible, la précipitation de la gélatine par le tanin semble devoir se faire de préférence du côté acide du point isoélectrique, zone d'acidité où les deux substances ont des charges opposées, et en fait la précipitation optima a lieu entre pH 4,4 et pH 4,6.

Pour des acidités plus fortes, la réaction est moins sensible et moins complète. Du côté alcalin du point isoélectrique il y a encore précipitation si l'alcalinité n'est pas trop forte. Ainsi à pH 4,9, il y a encore précipitation. A ce point la protéine se dissocie essentiellement comme une substance acide, mais l'ionisation alcaline, bien que très faible, n'est

pas nulle. L'addition de NaCl à la solution agrandit la zone de pH où se fait la précipitation, mais n'augmente pas la sensibilité de la réaction au pH optimum (Smorodintzeff et M^me^ Adoff).

La proportion des corps réagissants influe également sur la sensibilité de la réaction. En présence d'un grand excès de l'un des corps, la réaction se fait moins bien.

La meilleure précipitation des deux substances est obtenue pour une proportion d'une partie de gélatine à deux parties de tanin. Dans ce cas le précipité comprend la totalité des deux substances réagissantes, il ne reste plus rien dans la solution.

Au pH optimum la limite de détection du tanin par la gélatine est à peu près de 1 pour 150.000 et de la gélatine par le tanin de 1 pour 300.000. A pH 10, une solution à 0 gr. 25 % de gélatine n'est pas précipitée par le tanin.

Le pH optimum de la réaction et la sensibilité limite sont susceptibles de varier avec l'origine du tanin employé, mais présentent malgré tout des limites très étroites.

Acide picrique. — L'acide picrique est un agent de précipitation de la gélatine connu depuis longtemps et il est couramment employé dans la recherche qualitative et même dans le dosage (Berrar).

La précipitation n'a lieu qu'en milieu acide, en milieu alcalin elle ne se produit pas, le précipité obtenu étant soluble dans les alcalis.

Substances à fonction phénol. — Seyewetz et Meunier ont montré que la gélatine était précipitée de ses solutions par de nombreux phénols en solution dans l'eau.

Ainsi le phénol, la résorcine, l'orcine, l'hydroquinone, la pyrocatéchine, l'acide pyrogallique, l'acide picrique, le paranitrophénol, le chlorophénol, la monochlorhydroquinone, l'adurol, l'acide R (disulfo β naphtol 2.3.6), l'acide G (disulfo β naphtol 2.6.8), l'acide S (monosulfo β naphtol 2.6) sont des substances à fonction phénol qui comme l'acide picrique et le tanin précipitent la gélatine de ses solutions.

Les naphtols, dioxynaphtalines, les amines et aminophé-

nols ne précipitent pas la gélatine. Parmi les composés organiques ce sont uniquement les phénols ou leurs produits de substitution nitrés halogénés ou sulfoconjugués à l'état d'acides et non de sels qui sont susceptibles de produire la précipitation de la gélatine. Les phénols peu solubles dans l'eau comme l'α ou le β naphtol ainsi que les amines simples ou substituées à l'état de bases ou de sels ne la précipitent pas. Il en est de même des aminophénols simples ou substitués même s'ils sont très solubles dans l'eau.

Ces deux auteurs ont complété leurs recherches en étudiant la composition des précipités obtenus à partir de ces diverses substances.

Les précipités obtenus avec le phénol, la pyrocatéchine, la résorcine, l'hydroquinone, l'acide picrique, etc., sont solubles dans l'eau bouillante, ceux fournis par l'acide gallotanique ne le sont pas.

Après lavage et séchage de ces précipités, les auteurs ont dosé N en comparant le chiffre trouvé avec le chiffre fourni par une gélatine identique ayant subi les mêmes traitements à l'exception du traitement par le réactif précipitant.

La gélatine initiale contient 17,7 % de N.

Précipité obtenu avec :

Phénol 16,4	% de N
Résorcine 16,5	»
Hydroquinone 14,32	»
Pyrocatéchine 16,14	»
Acide pyrogallique 16,20	»
Acide picrique 17,59	»
Acide gallotanique 16,37	»

L'étude de la précipitation de la gélatine par les substances minérales et organiques a conduit MM. Lumière et Seyewetz aux conclusions suivantes :

La précipitation de la gélatine par les substances minérales et organiques est un phénomène qui donne lieu à la production de deux types de composés.

a) *Substances solubles dans l'eau chaude* dans lesquelles on retrouve les propriétés et la composition de la gélatine ini-

tiale : sels alcalins en solution concentrée, alcool, acétone, phénols à substitution acide.

b) *Substances insolubles dans l'eau chaude* où les propriétés et la composition du produit initial paraissent notablement modifiées : sels oxydants, acide gallotanique. Il convient de remarquer que ces dernières substances ont pour propriété commune le pouvoir de former de l'oxygène soit directement, soit en présence d'eau. La présence de certains corps comme le sulfate de soude, la thiocarbimide en particulier peut empêcher cette précipitation de la gélatine par les phénols.

Insolubilisation de la gélatine. — En dehors des substances qui précipitent la gélatine, il convient de considérer celles qui peuvent être ajoutées à ses solutions sans produire de précipitation mais qui donnent par refroidissement des gelées infusibles à 100°. Cette insolubilisation de la gélatine dans l'eau bouillante se manifeste également après immersion pendant un temps convenable de la gélatine sèche dans les solutions de substances provoquant l'infusibilité des gelées.

Le nombre de ces substances a été limité pendant longtemps aux sels de chrome et au formol mais cette propriété est commune à un grand nombre de produits provenant de l'oxydation à l'air des phénols en présence d'alcali et en particulier à des corps bien définis comme les quinones, quinhydrones, les chlorimines. Parmi les phénols pouvant fournir des composés d'oxydation susceptibles d'insolubiliser la gélatine on trouve la pyrocatéchine, l'hydroquinone, l'acide pyrogallique, l'acide gallique.

Dans le cas des sels minéraux l'insolubilisation paraît être seulement un phénomène d'oxydation mais la gélatine fixe ensuite une certaine quantité de l'oxyde du sel qui produit l'insolubilisation.

« Cet oxydé ne se fixe sur la gélatine que s'il peut se former à l'état colloïdal », dit Luppo-Cramer (Meunier).

Avec les substances organiques, l'insolubilisation paraît

s'accompagner de la fixation du résidu organique. Ainsi à partir de la gélatine insolubilisée au formol on peut régénérer le formaldéhyde en faisant bouillir avec l'eau la gélatine insolubilisée par cette substance. Mais aucune autre expérience probante ne permet d'affirmer que la fixation du résidu organique a lieu. Dans le cas des quinones et de leurs dérivés, ces corps ne peuvent être régénérés et la composition centésimale de la gélatine insolubilisée ne permet de tirer aucune conclusion à ce sujet.

La gélatine quinonisée constitue la forme la plus stable de gélatine insoluble connue jusqu'à ce jour car elle résiste non seulement à l'action de l'eau bouillante mais encore à l'action des acides et des alcalis étendus.

8° **Tannage de la gélatine**. — Le tannage de la gélatine consiste dans sa transformation en un produit insoluble dans l'eau bouillante. Ce tannage aura donc pour base l'action des substances insolubilisantes que nous venons d'étudier.

A) Tannage par les halogènes. — L'insolubilisation de la gélatine par l'eau de chlore ou l'eau de brome n'est pas réalisable bien que l'eau de chlore et l'eau de brome soient susceptibles de fournir avec la gélatine des précipités insolubles. Par ce traitement la gélatine gonfle, se liquéfie sous l'action de l'acide chlorhydrique formé avant d'être tannée. Par contre on obtient facilement le tannage à partir des hypochlorites. En plongeant dans la solution :

Eau	400
Hypochlorite de soude	100
Acide chlorhydrique	2

10 grammes de gélatine mince on obtient en vingt minutes une gélatine insolubilisée un peu colorée en jaune. Un traitement au bisulfite de soude suffit à blanchir et à enlever l'excès de Cl. D'après Meunier, le tannage par le chlore ou le brome est le résultat d'une réaction chimique portant vraisemblablement sur certains groupes aminés de la matière protéique en donnant naissance à des formes chloraminées ou bromaminées insolubles dans l'eau chaude.

B) Tannage par les sels minéraux. — Les sels de métaux lourds donnant des précipités insolubles dans l'eau comme les sels de Fe^{III} Ce^{III} Pt^{IV} Au^{III} pourraient être utilisés au tannage. Ce sont surtout les sels chromiques qui sont utilisés dans ce but, l'alun de chrome en particulier ; ces sels ne produisent pas de précipitation dans les solutions de gélatine, mais ce sont des agents d'insolubilisation.

La gélatine plongée dans une solution de bichromate de soude, puis soumise à l'action de la lumière, s'insolubilise dans l'épaisseur de la couche proportionnellement à l'intensité de la lumière qui l'a frappée. La gélatine réduit partiellement le bichromate sous l'action catalysante de la lumière en donnant l'oxyde de chrome qui produit le tannage (Namias).

C) Tannage par les substances organiques. — Parmi les substances organiques agissant sur la gélatine on ne peut employer pour le tannage que celles qui donnent des produits insolubles dans l'eau bouillante.

On peut tanner directement des feuilles de gélatine gonflées à l'eau en les plongeant dans des solutions de formol ou de benzoquinone.

D'après Meunier, dans les deux cas, le tannage est produit par une réaction sur les groupements aminés qu'il schématise ainsi :

$$R\,NH^2 + HCHO \rightarrow RN = CH^2 + H^2O$$

et

$$\begin{matrix} R\,NH^2 \\ R\,NH^2 \end{matrix} + C^6H^4\!\begin{matrix} \diagup \\ \diagdown \end{matrix}\!\begin{matrix} O \\ | \\ O \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} R - N \\ | \\ R - N \end{matrix}\!\begin{matrix} \diagdown \\ \diagup \end{matrix}\!C^6H^4 + 2H^2O$$

L'action du tanin est la plus employée. Elle est fonction de la nature du tanin employé, de son origine et des produits d'oxydation qui l'accompagnent. La présence de ces produits d'oxydation permet d'obtenir un tannage beaucoup plus solide. C'est là une notion bien connue dans la pratique.

DEUXIÈME PARTIE

Précipitation de la gélatine par les liquides neutres : liquides organiques, solutions salines.

SOMMAIRE

CHAPITRE I. — Précipitation de la gélatine par l'alcool éthylique.
CHAPITRE II. — Précipitation de la gélatine par l'acétone.
CHAPITRE III. — Précipitation de la gélatine par les solutions salines concentrées.

Dans cette seconde partie nous avons étudié la précipitation de la gélatine par les liquides neutres. Dans ces liquides neutres nous devons distinguer deux catégories :

1° Liquides organiques neutres ;

2° Solutions salines concentrées.

Parmi les liquides organiques neutres utilisés pour la précipitation des protéines : alcool méthylique, alcool éthylique, acétone, formol, nous n'avons étudié que l'alcool éthylique et l'acétone. L'alcool méthylique est un désalbuminant encore peu employé et ne présente pas d'avantages sur l'alcool éthylique.

Le formol ne précipite pas la gélatine de ses solutions (voir 1re partie, ch. VI, p. 6.)

Parmi les solutions salines concentrées précipitant les albumines, nous avons limité notre étude aux trois sels les plus couramment employés pour la précipitation et la séparation des matières protéiques, c'est-à-dire le sulfate de soude, le sulfate d'ammoniaque et le sulfate de magnésie.

CHAPITRE PREMIER

Précipitation de la gélatine par l'alcool éthylique.

I. Généralités sur l'action de l'alcool sur les protéines. — II. Travaux antérieurs. — III. Recherches personnelles : 1° Précipitation d'une solution de gélatine officinale par l'alcool. 2° Précipitation d'une solution de gélatine par l'alcool en milieu acide et en milieu alcalin. 3° Précipitation de la gélatine par l'alcool au point isoélectrique. 4° Degré alcoolique minimum nécessaire à la précipitation totale. 5° Précipitation de la gélatine par l'alcool en présence des sels. 6° Conclusions.

I. — Généralités sur la précipitation des protéines par l'alcool.

L'alcool éthylique est un bon agent de précipitation des matières protéiques, il précipite de leurs solutions toutes les protéines naturelles, albumines, globulines, caséine, etc... et même des protéines à molécules plus simples comme les histones. Il précipite également les produits de dédoublement des protéines, albumoses et peptones, et même en partie certains acides aminés tels l'asparagine et la tyrosine (Petitjean). Il a été très employé en raison de cette propriété soit pour le dosage pondéral des albumines dans les divers liquides biologiques, sérum sanguin, lait et liquides pathologiques divers, soit pour la défécation de ces liquides en vue de déterminations nécessitant l'élimination des protéines ; urée (méthode Widal et Javal), glucose, etc... Mais on lui préfère aujourd'hui pour cet usage les désalbuminants acides tels que les acides trichloracétique, tungstique, etc... Il était naturel de l'utiliser pour précipiter la gélatine de ses solutions ou des milieux où elle se trouve.

II. — Travaux antérieurs.

Dhéré employait l'alcool pour précipiter la gélatine de ses solutions afin de la purifier et de la déminéraliser. Ce procédé de purification fut également préconisé par Mörner (Hoppe-Seyler).

Trillat a utilisé cette propriété de l'alcool pour la recherche de la gélatine dans les gelées ou les confitures, mais il n'a pas apporté à son emploi toutes les conditions nécessaires pour avoir une précipitation rigoureuse. Les conditions d'acidité et d'alcalinité du milieu qui règlent la précipitation de la gélatine par l'alcool n'ont pas été formulées. Fenn a reconnu que la précipitation de la gélatine par l'alcool nécessitait une quantité d'alcool d'autant moindre pour être complète que la gélatine était plus proche du point isoélectrique (Lœb).

St Przylecki a étudié l'action des électrolytes et de l'alcool sur la gélatine prise à divers pH ; il s'est attaché surtout à étudier comment les sels modifiaient cette précipitation, mais il n'a pas recherché les conditions d'expérience nécessaires pour avoir une précipitation totale.

III. — Recherches personnelles.

Nos expériences ont eu pour but de préciser les conditions à réaliser pour obtenir la précipitation totale de la gélatine par l'alcool.

Nous avons d'abord étudié l'action de l'alcool sur la gélatine officinale en solution soit en versant l'alcool dans la solution de gélatine, soit en versant la gélatine dans l'alcool. Puis nous avons étudié cette même précipitation en milieu acide, en milieu alcalin et au point isoélectrique. Nous avons recherché ensuite le degré alcoolique qu'il était nécessaire d'atteindre pour obtenir la précipitation totale. Nous avons étudié en dernier lieu l'action des sels sur cette précipitation.

1° Précipitation d'une solution de gélatine par l'alcool.

A) Solution étendue. — *Expérience.* — A une solution

de gélatine officinale à 2 %, ajoutons progressivement de l'alcool à 96°, il ne se produit d'abord aucun précipité. En continuant l'addition d'alcool, le liquide se trouble et bientôt apparaît un précipité. Après addition de deux volumes d'alcool à un volume de solution gélatinée, nous obtenons un précipité aggloméré en une masse blanche, molle, élastique, adhérant au fond du verre où se fait la précipitation ; le liquide surnageant est blanc, opalescent.

Décantons ce liquide surnageant. Ajoutons de nouveau à ce liquide un volume d'alcool, nous obtenons un nouveau précipité de consistance plus ferme que le précédent, mais le liquide surnageant reste trouble.

Décantons à nouveau et continuons l'addition d'alcool, il ne se forme plus de précipité apparent, le trouble du liquide s'intensifie d'abord et diminue ensuite par la dilution. Ce liquide trouble ne se clarifie ni par filtration ni par centrifugation (Chevalier).

Deuxième expérience. — Plaçons maintenant dans un vase à précipiter 50 cc. environ d'alcool à 96° et versons-y progressivement une solution à 2 % de gélatine officinale. Chaque goutte de solution gélatineuse en tombant dans l'alcool donne un précipité blanc à aspect particulier de filaments d'albumine coagulée (Collin) ; en même temps, l'alcool se trouble. Au fur et à mesure qu'on ajoute la gélaline, le trouble s'accroît et la consistance du précipité diminue avec le titre alcoolique du mélange. Puis quand la quantité de solution gélatineuse ajoutée atteint un peu plus de la moitié du volume initial de l'alcool, la précipitation cesse en raison de la trop grande dilution de l'alcool.

B) Solution concentrée. — *Expérience.* — Prenons maintenant une solution à 5 % de la même gélatine et ajoutons progressivement de l'alcool à 96°. Le trouble apparaît de même que précédemment, mais l'apparition du précipité est plus rapide ; un volume et demi d'alcool suffit pour faire apparaître dans la solution un précipité important. Ce précipité mou, élastique, d'aspect fibreux particulier enserre

dans ses mailles une quantité importante de liquide facile à exprimer par trituration. En continuant l'addition d'alcool, la précipitation continue et on obtient le même résultat que dans le cas précédent, c'est-à-dire un précipité baignant dans un liquide trouble, opalescent, qui ne s'éclaircit ni par centrifugation ni par filtration.

Deuxième expérience. — En faisant tomber dans de l'alcool une solution de gélatine à 5 %, tout se passe comme avec la solution à 2 %, le précipité est plus important mais sa consistance diminue de même avec le titre final de l'alcool, et à partir d'une certaine concentration la précipitation ne se fait plus en raison de la grande dilution de l'alcool.

C) Conclusions. — Ces expériences nous montrent que lorsqu'on ajoute de l'alcool à une solution de gélatine ordinaire, on obtient :

D'une part un précipité dont la consistance varie avec la proportion d'alcool ajoutée ;

D'autre part un liquide trouble qu'il est impossible de clarifier mécaniquement.

L'addition de quelques gouttes de lessive de soude ou d'acide chlorhydrique à ce liquide trouble le clarifie rapidement. C'est donc que la présence d'acide ou d'alcali modifie l'action de l'alcool sur la gélatine.

2° Précipitation de la gélatine par l'alcool en milieu acide et en milieu alcalin.

A) Milieu acide. — *Solution étendue.* — Quand nous additionnons de trois fois son volume d'alcool à 96°, 10 cc. d'une solution de gélatine à 2 % contenant quelques gouttes d'acide chlorhydrique, il ne se produit ni trouble ni précipité. Avec la même quantité d'alcool et en milieu neutre la précipitation de la gélatine est notable.

Faisons tomber maintenant un peu de solution gélatinée dans de l'alcool chlorhydrique à 36 gr. 5 d'HCl par litre, préparé par exemple avec :

HCl à 182 gr. 5 ‰ (5 N)	200 cc.
Alcool absolu	800 cc.
Eau distillée, q. s. p.	1000 cc.

il n'y a pas de précipitation. En employant un alcool chlorhydrique de titre alcoolique plus élevé, 90° par exemple, on obtient un léger trouble.

Solution concentrée. — Reprenons ces expériences avec une solution de gélatine à 5 %. En versant quelques gouttes de cette solution dans de l'alcool chlorhydrique préparé comme ci-dessus, ont obtient un trouble notable.

L'addition de 4 volumes de cet alcool chlorhydrique à 1 volume de solution gélatinée produit un trouble important. En reprenant ces expériences avec des solutions gélatinées à 10 %, nous avons pu obtenir un précipité de gélatine pour les concentrations alcooliques fortes, et nous avons obtenu un trouble notable par addition de trois volumes d'alcool chlorhydrique à un volume de solution gélatinée.

B) Milieu alcalin. — *Solution étendue.* — Si à 10 cc. d'une solution de gélatine à 2 %, nous ajoutons deux ou trois gouttes de lessive de soude, elle n'est plus précipitée par addition de trois fois son volume d'alcool à 96°.

Si nous versons quelques gouttes de solution gélatinée dans une solution alcoolique de soude ainsi préparée :

Soude à 200 gr. °/₀₀ (5 N)	200 cc.
Alcool absolu	800 cc.
Eau distillée, q. s. p.	1000 cc.

il n'y a ni précipitation ni trouble. Mais si on verse un peu de solution gélatinée dans un alcool sodé de titre alcoolique plus élevé, on obtient un léger trouble.

Solution concentrée. — Prenons maintenant une solution de gélatine à 5 %. A 10 cc. de solution ajoutons deux ou trois gouttes de soude au 1/3 et 30 cc. d'alcool à 96°. Il se produit un trouble, mais il n'y a pas de précipitation.

De même si nous versons quelques gouttes de cette solution gélatinée dans l'alcool sodé préparé comme ci-dessus, il se forme un trouble notable. Avec la même quantité de soude et un titre alcoolique plus élevé, on obtient un liquide laiteux.

Dans les mêmes conditions, une solution gélatinée à 10 % donne d'une part un précipité et d'autre part un liquide laiteux que l'on ne peut clarifier mécaniquement.

C) Conclusions. — Ces expériences nous montrent que :

a) Les solutions de gélatine à 1 ou 2 % dont l'acidité ou l'alcalinité est éloignée de pH 7 ne donnent ni précipité ni trouble par addition d'un volume alcoolique égal à 4 fois le volume de la solution gélatinée ;

b) Dans les mêmes conditions, les solutions plus concentrées de gélatine (à 5 % ou 10 %) donnent un trouble qui ne se résout pas totalement en un précipité et que l'on ne peut séparer.

3° Précipitation de la gélatine par l'alcool au point isoélectrique.

Première expérience : Etudions d'abord la précipitation en milieu acide faible. Mettons dans un verre 30 cc. d'alcool à 96° et ajoutons 10 cc. de solution gélatineuse à 2 %. Il se produit un précipité et le liquide qui surnage est opalescent. Faisons varier progressivement le pH par addition d'acide acétique à 5 %. Après addition de quelques gouttes d'acide acétique, nous voyons se former dans le liquide de petits flocons que l'agitation précipite sur les parois du verre et sur l'agitateur ; le liquide opalescent s'éclaircit.

Donc pour une certaine acidité la précipitation de la gélatine par l'alcool se fait en donnant un précipité et un liquide clair. Mesurons le pH où se fait la floculation, nous trouvons pH 4,7.

Etudions maintenant cette précipitation à pH 4,7.

Deuxième expérience. — Pour étudier la précipitation de la gélatine isoélectrique par l'alcool, nous avons d'abord préparé une solution de gélatine à pH 4,7. Nous avons employé pour mesurer le pH la méthode colorimétrique. Nous avons utilisé pour cela l'échelle suivante à base de citrate de soude et d'acide chlorhydrique préparée avec :

1° Une solution citrique obtenue ainsi :

Dissoudre 21,008 d'acide citrique officinal dans 200 cc d'une solution normale de soude et compléter à un litre.

2° Acide chlorhydrique N/10.

Nous avons préparé une échelle allant de 3,69 à 4,95 avec :

Solution citrique. . . .	HCl N/10	PH
5 cc.	5 cc.	3,69
5,5	4,5	3,94
6	4	4,15
7	3	4,44
8	2	4,65
8,3	1,7	4,70
9	1	4,83
9,5	0,5	4,88
10		4,95

Indicateur : Rouge de méthyle (4,4 à 6) et bleu de bromophénol 2,8 à 4,6.

Nous avons amené la solution de gélatine à pH 4,7 par essais successifs en ajoutant d'abord HCl N/10 puis HCl N/100 ou NaOH N/100.

Ajoutons de l'alcool 96° à une solution de gélatine à 2 % ainsi préparée. Quand la quantité d'alcool ajoutée représente une fois et demie le volume de la solution gélatinée, la précipitation commence.

Après addition de 2 volumes d'alcool, nous avons un précipité aggloméré en une masse molle visqueuse et parfois le liquide surnageant est un peu trouble, mais si nous l'agitons le trouble se résout en un floculat qui adhère à l'agitateur et aux parois du verre tandis que le liquide s'éclaircit.

Versons maintenant 10 cc. de la même solution dans un Bécher contenant par exemple 10 cc d'alcool à 96°. Chaque goutte de solution gélatineuse y donne un précipité grumeleux. Parfois, au fur et à mesure que l'on ajoute la solution, le liquide alcoolique se trouble, mais une simple agitation suffit à transformer ce trouble en un floculat.

Le liquide surnageant devient clair et en même temps très facile à filtrer. Donc quand on précipite une solution

gélatineuse à pH4, 7 par l'alcool, on obtient un précipité et un liquide clair qu'il est facile de séparer par filtration.

Emploi des solutions tampons. — La préparation de solutions de gélatine à pH à 4,7 est une opération délicate qui demande parfois un grand nombre d'essais. D'autre part, la détermination colorimétrique du pH manque de précision. Aussi il nous est arrivé, au cours de nos expériences, d'obtenir après traitement de la solution gélatineuse par l'alcool un liquide restant trouble et n'ayant aucune tendance à floculer et à s'éclaircir par agitation. Parfois l'addition soit d'acide acétique, soit d'acétate de soude, nous a permis d'obtenir la floculation cherchée. Cette addition se faisant par tâtonnement conduit à des résultats peu certains. Nous avons préféré mettre à profit les propriétés des solutions tampons.

En ajoutant une solution tampon de pH 4,7 à une solution de gélatine amenée au voisinage de ce pH nous sommes sûrs de maintenir le pH final à 4,7

En additionnant nos solutions de gélatine prises au voisinage de pH 4,7 du 1/10 de leur volume de la solution tampon suivante :

Acide acétique M/5	46 cc.	
Acétate de soude M/5	54 cc.	(Meunier)

nous avons obtenu des solutions de gélatine qui traitées par l'alcool donnaient après agitation un précipité et un liquide clair faciles à séparer par filtration.

La détermination préalable du pH de la gélatine n'est pas indispensable ; il suffit qu'elle ne soit ni trop fortement acide ni trop fortement alcaline. Une solution de gélatine ordinaire additionnée du 1/10 de son volume de la solution tampon précédente nous donne de façon constante, après traitement à l'alcool, un précipité et un liquide surnageant absolument limpide après agitation.

Nous avons utilisé également la solution tampon suivante :

Citrate disodique M/10	83	
HCl N/10	17	(Vérain et Chaumette)

Les résultats obtenus ont été identiques.

Déjà nous pouvons conclure qu'il n'y a qu'au point isoélectrique que l'on peut obtenir la précipitation totale de la gélatine par l'alcool puisqu'il n'y a qu'à ce point que le liquide final ne retient pas la gélatine en suspension.

Nous allons rechercher maintenant quel doit être le titre alcoolique minimum pour que la précipitation de la gélatine par l'alcool soit bien complète. Pour cela nous avons étudié la précipitation en faisant varier d'abord le titre alcoolique puis en faisant varier ensuite la concentration de la solution gélatineuse employée.

4° Degré alcoolique minimum nécessaire à une précipitation totale.

Première expérience. — Soit une série de Béchers numérotés de 1 à 5 contenant respectivement 10 cc., 20 cc., 30 cc., 40 cc., 50 cc. d'alcool à 96°

Versons dans chacun 10 cc. de solution gélatineuse à 2 % contenant le 1/10 de son volume de solution tampon de pH 4,7.

Dans le Bécher I, il n'y a pas de précipitation.

Dans le Bécher II, il se forme un précipité abondant. Après une soigneuse agitation pour éclaircir le liquide surnageant, nous obtenons un liquide clair surmontant un précipité mou élastique un peu pâteux.

Dans le Bécher III, il se forme un précipité plus ferme que le précédent. Ce liquide un peu trouble d'abord se clarifie facilement par agitation.

Dans les Béchers IV et V, le précipité est plus ferme, prend un aspect tendineux.

La déshydratation plus ou moins poussée est vraisemblablement la cause de ces différences d'aspect.

Chaque solution est séparée du précipité par filtration au papier, à l'exception de la solution I où il n'y a aucune précipitation. Pour séparer le liquide II du précipité, il est nécessaire de triturer soigneusement ce dernier pour en exprimer le liquide inclus.

Cette précipitation semble totale, pour nous en assurer nous avons utilisé deux tests :

1° Biuret ;

2° Dosage de N.

Nous avons d'abord concentré les filtrats au volume de 5 ou 10 cc. et sur le résidu nous avons fait la réaction du Biuret.

2	++
3	+
4	?
5	—

Pour le dosage de l'azote, nous avons fait passer la totalité du résidu de l'évaporation dans un microkjeldalh.

Nous avons ajouté pour la minéralisation 2 cc. du mélange suivant (Salmon) :

$SO^4 K^2$	1 g.
$SO^4 Cu$	1
$SO^4 H^2$ pur	25 cc.

Après minéralisation, le NH^3 formé a été dosé par distillation dans l'appareil de Parnas et Wagner, le distillat était reçu dans une solution N/50 de SO^4H^2, l'excès d'acide a été titré par NaOH N/50 en présence de rouge de méthyle.

Les résultats obtenus sont les suivants :

I.	L'azote resté soluble y représente la totalité de la prise d'essai soit.....	28 mmg. de N
II.	Il reste.....	1 mmg. 44
III.	.....	0 mmg. 68
IV.	.....	0 mmg. 32
V.	.....	0 mmg. 24

Nous avons continué l'expérience pour de plus fortes concentrations en alcool en précipitant 10 cc. de solution gélatineuse à 2 % dans

60 70 80 90 100 cc.

d'alcool à 96°.

Après agitation et filtration, nous avons concentré les filtrats jusqu'à réduction au volume de 10 cc. et nous avons dosé N resté dans ce résidu. En opérant comme ci-dessus, nous avons trouvé :

6	Il reste.....	0 mmg. 17	de N soluble.
7	.....	0 mmg. 14	—
8	.....	0 mmg. 14	—
9	.....	0 mmg. 12	—
10	.....	0 mmg. 12	—

Avec les nombres ainsi obtenus, nous pouvons construire une courbe qui montre la décroissance d'abord rapide de la quantité d'azote restée soluble, puis cette décroissance ralentit, et pour de fortes concentrations en alcool la quantité d'azote soluble reste à peu près fixe. (Voir courbe I, page 87).

En V nous avons un biuret négatif, il ne reste que très peu d'azote. C'est, semble-t-il, la quantité minima d'alcool à employer pour avoir une précipitation totale.

Cette proportion d'alcool représente un titre final de 80°.

Action de la concentration de la solution gélatineuse. — *Solutions concentrées.* — Nous avons répété l'expérience précédente avec des solutions de gélatine de concentrations différentes. Nous avons employé pour cela des solutions à 5 % et à 10 %. Ces solutions se prenant rapidement en gelées, il est indispensable pour avoir des résultats comparables entre eux de faire les prises d'essai dans les mêmes conditions pour qu'elles soient bien identiques.

Solution à 5 %.

I.	Pas de précipitation, tout l'azote de la prise d'essai est resté soluble, soit.....			71 mmg.	
II.	Biuret	++	il reste.....	4 mmg. 83	de N soluble.
III.	»	+	»	2 mmg. 51	—
IV.	»	?	»	1 mmg. 31	—
V.	»	—	»	0 mmg. 44	—
VI.	»	—	»	0 mmg. 31	—
VII.	»	—	»	0 mmg. 25	—
VIII.	»	—	»	0 mmg. 25	—
IX.	»	—	»	0 mmg. 23	—
X.	»	—	»	0 mmg. 23	—

Solution à 10 %.

I.	Pas de précipitation		il y a.	142 mmg.	de N soluble.	
II.	Biuret	++	il reste.....	6 mmg.	16	—
III.	»	+	»	2 mmg.	90	—
IV.	»	?	»	1 mmg.	50	—
V.	»	—	»	0 mmg.	84	—
VI.	»	—	»	0 mmg.	63	—
VII.	»	—	»	0 mmg.	40	—
VIII.	»	—	»	0 mmg.	40	—
IX.	»	—	»	0 mmg.	38	—
X.	»	—	»	0 mmg.	36	—

Ces expériences nous montrent qu'avec les solutions concentrées, la quantité d'azote qui reste soluble diminue de la même manière qu'avec les solutions à 2 %, décroissance d'abord rapide puis très lente.

2° *Solutions étendues. — Solution à 1 %.*

I.	Pas de précipitation,		tout l'azote, soit	14 mmg.	est resté soluble.	
II.	Biuret	+	il reste.....	0 mmg.	70	de N soluble.
III.	»	?	»	0 mmg.	35	—
IV.	»	?	»	0 mmg.	14	—
V.	»	—	»	0 mmg.	09	—
VI.	»	—	»	0 mmg.	07	—
VII.	»	—	»	0 mmg.	07	—

Nous n'avons pas dosé l'azote resté en solution pour des titres alcooliques plus élevés, les quantités restées en solution dépassant les limites de sensibilité pour les prises d'essai mises en œuvre.

Conclusions. — Ces résultats nous permettent de faire les remarques suivantes :

A partir d'un titre alcoolique final de 80° (1 vol. dans 5 vol. d'alcool), le biuret est négatif quelle que soit la concentration de la solution gélatineuse précipitée. Mais le filtrat retient toujours un peu d'azote en solution.

Pour des proportions plus importantes d'alcool, la quantité d'azote restant soluble ne diminue que très lentement, et pour un même titre alcoolique final elle semble en proportion directe avec la quantité de gélatine mise en œuvre.

Nous n'avons pas précisé l'origine de cet azote. Sans doute provient-il de divers produits d'hydrolyse existant dans la gélatine.

En faisant des solutions de gélatine contenant la même quantité d'azote que les résidus d'évaporation des filtrats pour y faire la réaction de biuret, nous n'avons pas obtenu de conclusions certaines à ce sujet car une solution contenant moins de 0 g. 03 de gélatine dans 100 cc. d'eau pure ne donne pas la réaction du biuret. L'azote restant peut tenir à l'azote de cette quantité de gélatine et à des produits d'hydrolyse.

5° Action des sels sur la précipitation de la gélatine par l'alcool au point isoélectrique.

A) Généralités sur l'action des sels sur les mélanges gélatine-alcool. Expériences de St Przylecki. — Nous avons vu dans la première partie (ch. VI, § 2) de cette étude que les sels neutres exerçaient une action solubilisante sur la gélatine.

St Przylecki a montré d'autre part que la présence de sels modifiait les conditions de la précipitation de la gélatine par l'alcool. Il a montré que la présence de certains sels était susceptible de retarder ou d'amener l'opalescence ou la coagulation d'une solution alcoolique de gélatine suivant la nature du sel, la valeur des ions qui le constituent, la quantité de sel contenu dans la solution et le pH de cette solution.

Nous sommes attachés à étudier dans quelle mesure ces sels interviennent quand on opère au point isoélectrique.

B) Choix des sels étudiés. — Ne cherchant pas à établir une liste complète des sels pouvant changer les conditions de la précipitation, nous nous sommes contenté d'étudier l'action des plus courants.

Parmi ceux étudiés par St Przylecki, nous avons choisi :

$NaCl$, $MgCl^2$, SO^4Na^2, SO^4Mg, Fe^3Cl

afin d'avoir une liste comprenant :

1 sel à anion et à cation monovalents	$NaCl$
1 sel à anion mono et cation divalent	$MgCl^2$
1 sel à anion divalent et à cation mono	SO^4Na^2
1 sel à anion et cation divalents	SO^4Mg
1 sel à anion mono et à cation trivalents	$FeCl^3$

A cette liste de sels étudiés nous avons ajouté $CaCl^2$ en raison de l'action solubilisante bien connue qu'exercent les sels de Ca sur la gélatine.

C) Préparation des solutions. — *Solutions salines.* — Nous avons préparé une solution M/10 de chaque sel (sauf pour $FeCl^3$) à pH 4,7 afin d'éviter une modification de concentration en ions H des solutions gélatineuses auxquelles nous avons ajouté ces solutions car nous avons opéré en l'absence de solutions tampons pour éviter l'action possible des sels utilisés comme tampons.

Plus loin nous examinerons le moyen d'étudier l'action de $FeCl^3$ à pH 4,7.

Solutions gélatineuses. — Dans 6 ballons de 50 cc. numérotés de I à VI nous avons placé 25 cc. de solution gélatineuse à 10 % et à pH 4,7 mesurés dans des conditions absolument identiques pour tous les essais.

Nous avons ajouté :

Dans I,	25 cc. de solution	M/10	de $NaCl$
II,	25 cc.	M/10	$CaCl^2$
III,	25 cc.	M/10	$MgCl^2$
IV,	—	—	$MgSO^4$
V,	—	—	SO^4Na^2
VI,	eau distillée		(témoin)

Comme il nous était impossible d'obtenir une solution M/10 de $FeCl^3$ à pH 4,7, nous avons opéré de la façon suivante :

Dans deux ballons de 100 cc. nous avons placé 50 cc. de solution gélatinée à 10 % amenée à pH très bas, par addition d'un peu de HCl N/10. Puis nous avons mis dans chacun la quantité prescrite (1/200 de molécule, soit 0 g. 81 de

$FeCl^3$, soit 3 cc. 1 de la solution officinale à 26 % de $FeCl^3$).

Dans ces conditions l'addition de $FeCl^3$ à la gélatine ne produit pas de précipitation.

L'un des deux ballons nous a servi à déterminer la quantité de soude N/10 nécessaire pour amener le système à pH 4,7. La quantité de soude ainsi déterminée était ajoutée au second ballon en agitant bien soigneusement pour éviter des précipitations, puis nous avons complété à 100 cc. En opérant ainsi nous avons pu obtenir sans précipitation une solution de gélatine à pH 4,7 contenant du perchlorure de fer. C'est la solution VII.

Chaque solution contient 5 % de gélatine et 1/20 de molécule de sel par litre :

D) Etude de la précipitation de ces solutions. — Nous avons pris sept Béchers numérotés de 1 à 7, contenant 60 cc. d'alcool à 96°. Nous avons ajouté à chacun 10 cc. de solution saline et gélatinée correspondant à chacun des mélanges I à VII. Nous avons préféré employer 60 cc. d'alcool au lieu de 50, car 50 cc. représentent la quantité-limite, nous estimons qu'il vaut mieux pour assurer la précipitation totale opérer un peu au-dessus de cette limite.

Le contenu de chaque verre est agité soigneusement pour obtenir la floculation complète et un liquide clair.

Dans les trois premiers verres, la précipitation se fait normalement comme dans le témoin 6. En 4 nous avons observé la précipitation du sel par l'alcool (SO^4 Mg), en 7 nous avons remarqué la forte coloration du précipité alors que la solution surnageante est restée incolore.

Après filtration et concentration du filtrat alcoolique jusqu'à réduction à 10 cc. environ, nous avons dosé l'azote resté soluble dans chacun.

Dans 6	solution étalon	il reste	0 mmg. 31 de N soluble
1	NaCl	.....	0 mmg. 92 —
2	$CaCl^2$	.....	1 mmg. 56 —
3	$MgCl^2$	.....	1 mmg. 37 —
4	$MgSO^4$	.....	0 mmg. 46 —
5	SO^4Na^2	.....	0 mmg. 44 —
7	$FeCl^3$	.....	0 mmg. 81 —

En nous reportant à ces résultats nous observons que la précipitation de la gélatine par l'alcool au point isoélectrique :

1° est moins complète en présence de sels qu'avec de la gélatine sans sel,

2° que les chlorures paraissent gêner cette précipitation plus que les sulfates.

Mais on peut se demander si la précipitation des sulfates par l'alcool n'est pas la cause de cette différence d'action.

En étudiant l'action des sels sur la gélatine nous avons vérifié que les sels tampons employés dans les expériences n'avaient pas d'action solubilisante.

La solution acide acétique-acétate de soude et la solution citrate-acide chlorhydrique se sont révélées totalement inactives, nous avons fait les expériences comparatives avec une solution à 5 % à pH 4,7 sans sels tampons, et des solutions identiques contenant l'une le 1/10 de son volume de solution acétique à pH 4,7, l'autre le 1/10 de son volume de solution citrate-acide chlorhydrique.

Nous avons trouvé avec ces solutions des quantités d'azote restant soluble absolument identiques.

6° Conclusions. — Il résulte de ces expériences que pour *précipiter* commodément et *totalement* la gélatine par l'alcool, il faut :

a) *Opérer au voisinage du point isoélectrique* de la gélatine, ce qui est facilement réalisé à l'aide de sels tampons.

b) *Obtenir un titre alcoolique final d'au moins 80°.*

c) *Eviter la présence en quantités notables de certains sels* comme NaCl, $CaCl^2$, $MgCl^2$ qui gênent la précipitation.

CHAPITRE II

Précipitation de la gélatine par l'acétone.

I. Généralités. — Travaux antérieurs. — II. Recherches personnelles : 1° Précipitation de la gélatine ordinaire par l'acétone. 2° Précipitation de la gélatine par l'acétone en milieu acide et en milieu alcalin. 3° Précipitation de la gélatine par l'acétone au point isoélectrique. 4° Concentration minima en acétone nécessaire à une précipitation totale. 5° Précipitation de la gélatine par l'acétone en présence de sels. 6° Conclusions.

I. — Généralités. — Travaux antérieurs.

L'acétone est comme l'alcool un excellent agent de précipitation des protéines.

Bordas et Touplain ont reconnu en 1901 que l'acétone pouvait être utilisée pour la précipitation de l'albumine, la caséine, la gélatine. C'est Piettre et Vila qui en ont généralisé l'emploi en l'utilisant pour le dosage et la séparation des protéines dans les liquides biologiques.

L'acétone précipite toutes les protéines de leurs solutions ainsi que les albumoses et les peptones, et, même les polypeptides sont insolubles dans l'acétone. Son action sur la gélatine a été peu étudiée.

II. — Recherches personnelles :

1° Précipitation de la gélatine ordinaire par l'acétone. — A) Solutions étendues. — En versant une solution de gélatine à 2 % dans l'acétone, il se produit comme avec l'alcool un précipité blanc qui s'agglomère en une masse d'aspect un

peu tendineux ; le liquide qui surnage est trouble, opalescent et ne se clarifie ni par filtration ni par centrifugation.

Le précipité formé très dur au début acquiert une consistance plus molle à mesure que l'acétone est diluée par la solution ajoutée.

Versons maintenant de l'acétone dans une solution de gélatine à 2 %, les premières gouttes d'acétone qui tombent déterminent la formation d'un précipité qui disparaît en se répandant dans la masse ; puis l'addition d'une plus grande quantité d'acétone provoque une précipitation persistante. Lorsque la quantité d'acétone ajoutée atteint un volume égal à celui de la solution, le précipité s'agglomère en une masse blanche molle d'aspect fibreux, enserrant dans ses mailles une grosse quantité de liquide. Le liquide qui surnage est trouble, opalescent. Triturons un peu le précipité pour en exprimer le liquide et décantons. Ajoutons de nouveau un volume d'acétone, il y a précipitation d'une nouvelle quantité de gélatine. Décantons une seconde fois le liquide surnageant, ajoutons de l'acétone, il ne se produit pas de précipité mais le liquide reste trouble.

B) Solutions concentrées. — Etudions maintenant ce qui se passe avec les solutions concentrées.

Versons de l'acétone dans une solution de gélatine à 5 % par exemple. Tout se passe comme précédemment, mais le précipité est plus important. Si nous ajoutons de façon massive un volume d'acétone à un volume de solution gélatinée, nous obtenons un précipité occupant la presque totalité du volume de la solution primitive, mais une simple trituration suffit pour exprimer le liquide inclus.

En versant dans l'acétone, la solution gélatineuse à 5 %, nous obtenons le même résultat qu'avec la solution à 2 %.

Dans toutes ces expériences nous avons obtenu un précipité surmonté d'un liquide opalescent qu'il nous a été impossible de clarifier mécaniquement.

Mais le trouble ou le précipité obtenu par action de l'acétone sur une solution de gélatine disparaît par addi-

tion d'acides forts ou d'alcalis : nous en avons été amené à étudier la précipitation de la gélatine en fonction de la réaction du milieu.

2° **Précipitation de la gélatine, par l'acétone en milieu acide et en milieu alcalin.** — Si à 5 cc. d'une solution de gélatine à 2 %, contenant une goutte d'HCl pur, ou une goutte de lessive de soude, nous ajoutons 5 cc. d'acétone il ne se produit aucune précipitation. On peut donc en conclure déjà que la présence d'acide ou d'alcali dans une solution de gélatine, empêche sa précipitation par l'acétone.

Milieu acide. — Nous avons étudié cette action avec de l'acétone contenant 36 gr. 5 d'HCl par litre préparé ainsi :

Acétone.....	80 cc.
HCl. 5 N.....	20 cc.

En additionnant une solution à 2 % de gélatine de son volume de ce liquide, il n'apparaît ni trouble ni précipité. Après addition de 1 volume 1/2 d'acétone chlorhydrique, le trouble apparaît ; après addition de 2 volumes, nous avons obtenu un liquide laiteux, mais il n'y a pas de précipitation.

En opérant de même avec une solution de gélatine à 5 %, nous avons obtenu après addition de 2 volumes d'acétone un précipité surmonté d'un liquide fortement opalescent.

En versant dans l'acétone chlorhydrique la solution gélatineuse, nous avons obtenu un précipité et un liquide opaque laiteux.

La présence d'acide chlorhydrique a retardé la précipitation, mais en milieu chlorhydrique, le liquide surmontant le précipité reste plus trouble qu'en milieu neutre.

Milieu alcalin. — Ne pouvant obtenir une solution acétonique de soude à 40 grammes par litre, en raison de la faible solubilité de la soude dans l'acétone, nous avons opéré en mettant la soude dans la solution gélatinée de façon à obtenir une concentration finale identique, afin

de mener l'expérience en parallèle avec l'expérience à HCl.

Soit 3 tubes contenant 10 cc. de gélatine à 2 %. Ajoutons respectivement :

2 cc. — 3 cc. 4 cc. de NaOH 5N

puis :

8 cc. 12 cc. 16 cc. d'acétone

Dans le premier tube nous n'avons pas de précipité. Dans le second nous avons un trouble, le troisième prend un aspect laiteux.

Ajoutons à 50 cc. d'acétone, un mélange de 10 cc. de soude 5 N et de 10 cc. de gélatine à 2 %, il y a précipitation, et le liquide surnageant est fortement opalescent.

Donc la soude de même que l'acide chlorhydrique modifie la précipitation de la gélatine par l'acétone et conduit toujours à l'obtention d'un liquide fortement opalescent ; opalescence due à de la gélatine restée en suspension dans le liquide. Toutefois, nous pouvons remarquer que l'action des acides forts et des bases fortes est moins accentuée avec l'acétone qu'avec l'alcool. Une solution de gélatine à 2 % se trouble par addition d'acétone chlorhydrique, donne un précipité pour les fortes concentrations en acétone chlorhydrique, alors qu'elle ne donne aucun trouble ni aucun précipité avec l'alcool chlorhydrique ou sodé ;

3° **Précipitation de la gélatine par l'acétone au point isoélectrique.** — *Première expérience.* — Soit une solution de gélatine à 2 %, préparée avec de la gélatine ordinaire dont le pH oscille en général de 6 à 7. Additionnons cette solution de 3 fois son volume d'acétone. Nous obtenons un précipité et un liquide surnageant opalescent. Faisons varier progressivement le pH en ajoutant goutte à goutte de l'acide acétique à 5 % en agitant soigneusement. A un certain moment, nous voyons apparaître dans le liquide de petits flocons qui se précipitent sur les parois du vase et sur l'agitateur, tandis que le liquide s'éclaircit.

Pour une certaine acidité il y a donc résolution du trouble en un précipité.

Voyons ce qui se passe au point isoélectrique.

Deuxième expérience. — Soit une solution de gélatine à 2 %, à pH 4,7. Additionnons cette solution de son volume d'acétone, il se forme un précipité mou, élastique ; agitons et triturons pour exprimer le liquide retenu par le précipité. Le liquide surnageant, d'abord un peu trouble, se clarifie par agitation. Le trouble se résout en un précipité.

Versons maintenant un peu de cette solution de gélatine dans l'acétone. La gélatine est précipitée tandis que le liquide se trouble, le précipité est grumeleux, dur, à aspect d'albumine coagulée. Agitons, nous voyons se former dans le liquide de petits flocons que l'agitation précipite sur les parois du verre et sur l'agitateur, laissant un liquide clair, limpide, facile à filtrer.

Donc au point isoélectrique, l'addition d'acétone à une solution gélatineuse amène la formation d'un précipité facile à séparer par filtration du liquide clair qui le baigne : à ce point isoélectrique, il nous sera possible d'obtenir la précipitation complète de la gélatine.

Pour réaliser pH 4,7 dans la solution de gélatine, nous avons mis à profit les propriétés des solutions tampons, comme nous l'avons fait en étudiant la précipitation de la gélatine par l'alcool. Une solution de gélatine ordinaire additionnée du 1/10 de son volume de solution tampon (solution acétique ou citrique) est facilement précipitée par l'acétone. Après agitation, le précipité obtenu est facile à séparer par filtration du liquide clair qui le baigne.

Au cours de ces expériences, nous avons remarqué que la précipitation de la gélatine par l'acétone est moins sensible aux faibles variations de pH que la précipitation par l'alcool, c'est-à-dire que la zone d'acidité (voisine de pH 4,7) où se fait la floculation, est plus étendue pour l'acétone que pour l'alcool. Cette propriété est sans doute en relation avec le pouvoir ionisant des deux liquides. Le pouvoir ionisant

de l'acétone est en effet beaucoup plus faible que celui de l'alcool.

4° **Concentration minima en acétone nécessaire à une précipitation complète.** — On ne peut parler de précipitation totale de la gélatine qu'au point isoélectrique, car nous avons vu que dans les autres cas le liquide retenait toujours un peu de gélatine en suspension. C'est donc à ce point que nous étudierons la précipitation totale.

Solutions étendues. — Soit 5 Béchers numérotes de I à V dans lesquels nous avons placé respectivement :

10 cc. 20 cc. 30 cc. 40 cc. 50 cc.

d'acétone. Dans chacun, nous ajoutons 10 cc. de solution gélatinée contenant 1 10 de son volume de solution tampon à pH 4,7. Le contenu de chaque verre est agité soigneusement pour aider la floculation et la rendre bien complète. Nous obtenons en I, un précipité mou, spongieux, à consistance de gelée semi-fluide. En II, un précipité un peu plus ferme mais conservant un aspect géliforme.

Dans les autres verres, le précipité est grumeleux, plus ferme, mieux déshydraté. Séparons par filtration les précipités et recueillons les filtrats. Après concentration des filtrats, évaporation de l'acétone, faisons la réaction du biuret, puis dosons l'azote resté soluble dans chacun :

	Biuret
I	++
II	?
III et suivants	—

Le dosage d'azote resté soluble est fait après évaporation de l'acétone, minéralisation au kjeldalh et dosage de NH^3, formé par distillation (voir 2e partie, ch. 1, § 4).

La prise d'essai renferme.....	28 mmg. 4 de N	
en I, il reste.....	2 mmg. 80 de N	soluble
II »	0 mmg. 31	»
III »	0 mmg. 09	»
IV »	0 mmg. 07	»
V »	0 mmg. 06	»

L'expérience a été poursuivie pour des concentrations en acétone plus élevées, les résultats ont été identiques.

VI	Biuret, il reste.....	0 mmg. 06 de N soluble
VII	» »	0 mmg. 06 »

Ces quantités d'azote sont d'ailleurs beaucoup trop faibles pour être dosées avec précision et les chiffres que nous donnons n'ont qu'une valeur de comparaison.

Nous pouvons admettre qu'à partir du troisième, la précipitation est complète.

Solutions concentrées. — Nous avons repris ces expériences avec des solutions de gélatine à 5 % et à 10 % en suivant la même technique. Nous avons mis 10 cc. de solution gélatinée dans :

10 cc. 20 cc. 30 cc. 40 cc. 50 cc. 60 cc.

d'acétone et nous avons dosé l'azote resté soluble dans chaque filtrat. Nous avons trouvé :

	Solution à 5 % Prise d'essai : 71 mmg. de N Biuret		Solution à 10 % Prise d'essai : 142 mmg. de N Biuret	
I	+	7 mmg. 05 de N soluble	+	9 mmg. 82 de N
II	?	1 mmg. 15	?	1 mmg. 78
III	—	0 mmg. 25	—	0 mmg. 59
IV	—	0 mmg. 20	—	0 mmg. 43
V	—	0 mmg. 17	—	0 mmg. 31
VI	—	0 mmg. 16	—	0 mmg. 30

En portant ces résultats sur un graphique, nous obtenons trois courbes (voir page 87, courbes I, II, III) qui montrent qu'à partir de 3 volumes d'acétone pour un volume de solution gélatinée, la quantité d'azote resté soluble ne diminue que très peu. A partir de cette concentration finale en acétone le biuret est négatif. La concentration finale de 75 % en acétone, peut donc être considérée comme la concentration minima nécessaire à la précipitation totale.

Nous pouvons remarquer d'autre part que pour les fortes concentrations en acétone, de même que pour l'alcool, la

quantité d'azote retenue est proportionnelle à la quantité de gélatine mise en œuvre.

Pour les fortes concentrations, la quantité d'azote retenue est moins importante avec l'acétone qu'avec l'alcool, comme on peut le voir facilement en comparant les courbes représentant l'azote soluble obtenu avec l'alcool (*trait plein*) et avec l'acétone (*trait pointillé.*)

5° **Précipitation de la gélatine par l'acétone en présence de sels.** — Pour terminer l'étude de la précipitation de la gélatine par l'acétone, nous avons étudié l'action des sels sur cette précipitation. Nous avons utilisé pour cette étude, les solutions préparées pour étudier l'action des sels sur la précipitation de la gélatine par l'alcool (voir chap. I, § 5).

Nous avons versé 10 cc. de solution saline et gélatineuse dans 40 cc. d'acétone et nous avons dosé l'azote resté soluble dans chaque filtrat.

Nous avons trouvé dans chacun des filtrats des quantités d'azote comprises entre 0 mmg. 20 et 0 mmg. 23, ce qui nous a permis de conclure que la présence de sels n'a aucune action sur la précipitation de la gélatine par l'acétone au point isoélectrique.

6° **Conclusions.** — Ces expériences nous amènent aux conclusions suivantes :

La *précipitation* de la gélatine par l'acétone *est complète :*

a) *Lorsqu'on opère à pH 4,7*, c'est-à-dire au point isoélectrique ;

b) *Quand la concentration finale* de l'acétone dans le mélange *atteint* 75 %.

Cette *précipitation* est à peu près *insensible* à la présence de sels minéraux dans la gélatine.

CHAPITRE III

Précipitation de la gélatine par les solutions salines concentrées.

1° Généralités. 2° Précipitation d'une solution de gélatine à 2 %. 3° Précipitation d'une solution de gélatine à 5 %. 4° Précipitation de la gélatine par les sels en milieu acide et en milieu alcalin. 5° Conclusion.

1° **Généralités.** — Les sulfates de soude d'ammoniaque et de magnésie sont très couramment utilisés au laboratoire pour précipiter les protéines et pour les séparer.

Ainsi le sulfate de soude employé à demi-saturation à 37°, précipite les globulines sans toucher aux albumines et il a été utilisé en raison de cela pour la séparation des albumines sériques (Méthode de Howe). Howe utilise pour cet usage une solution de SO^4Na^2 anhydre à 222 ‰. Guillaumin emploie la solution de sulfate cristallisé à 520 ‰, ce qui représente 229 ‰ de sulfate anhydre. La solution saturée à 37° précipite la totalité des albumines.

Le sulfate d'ammoniaque à saturation précipite toutes les albumines. A demi-saturation il ne précipite que les globulines. L'action de la solution saturée sur les produits de digestion des protéines a servi à les classer en albumoses et peptones suivant qu'ils sont insolubles ou solubles dans cette solution.

Le sulfate de magnésie à saturation précipite les globulines sans précipiter les albumines vraies, il précipite également les histones.

Nous avons étudié l'action de ces sels sur la gélatine en utilisant les solutions salines suivantes :

a) Sulfate de soude anhydre.....		229 gr.
Eau.....	q. s. p.	1.000 cc.

b) Sulfate d'ammoniaque..... 400 g.
Eau distillée..... q. s. p. 1.000 cc.

ce qui correspond sensiblement à la solution saturée à froid.

c) Sulfate de magnésie cristallisé..... 600 g.
Eau distillée..... q. s. p. 1.000 cc.

2° **Précipitation d'une solution de gélatine à 2 % par les sels.** — *Première expérience.* — A 10 cc. d'une solution de gélatine officinale, ajoutons goutte à goutte en agitant un peu de solution saline, il se forme à chaque goutte un précipité qui se redissout par agitation et quand le volume de solution saline ajoutée atteint :

9 cc. pour la solution de sulfate de soude,
6 cc. pour la solution de sulfate d'ammoniaque,
11 cc. 5 pour la solution de sulfate de magnésie,

le précipité formé cesse de se redissoudre et s'accroît si nous continuons l'addition de solution saline.

Versons maintenant 15 cc. de solution gélatinée dans 10 cc. de solution saline, il se forme tout d'abord un précipité abondant puis la précipitation diminue au fur et à mesure de l'addition, et quand les 15 cc. de solution gélatinée sont versés, les précipités formés dans les solutions de sulfate de soude et de sulfate de magnésie sont entièrement dissous ; pour la solution de sulfate d'ammoniaque, il faut ajouter 18 cc. de solution gélatinée pour que la redissolution du précipité soit totale.

Dans les trois cas, le précipité formé est facilement soluble dans l'eau froide ou par simple dilution de la solution saline, c'est un relargage. Il n'y a pas de précipitation tant que la concentration finale du sel dans la solution n'atteint pas

108 gr. °/oo pour le sulfate de soude ($SO^4 Na^2$)
150 gr. °/oo pour le sulfate d'ammoniaque ($SO^4 (NH^4)^2$)
320 gr. °/oo pour le sulfate de magnésie $SO^4Mg, 7 H^2O$.

Deuxième expérience. — Cherchons maintenant la concentration saline nécessaire à une précipitation totale. Soit

3 séries de 6 Béchers numérotés de 1 à 6 contenant chacun 10 cc. de solution gélatinée à 2 %, et ajoutons respectivement :

10 cc. ; 20 cc. ; 30 cc. ; 40 cc. ; 50 cc. ; 60 cc. de solution saline.

1re Série. Sulfate de soude.
2e Série. Sulfate d'ammoniaque.
3e Série. Sulfate de magnésie.

Dans chacun, il se produit une précipitation abondante à l'exception du 1er Bécher de la troisième série. Agitons, laissons reposer une demi-heure. Les 6 verres de la première série sont portés dans une étuve à 37°. Au bout de ce temps, filtrons.

Le contenu du 1er verre de la première série ne filtre pas. Celui du second verre filtre mal, les 4 autres filtrent bien.

Tous ceux de la deuxième série filtrent bien et dans la troisième série le contenu du premier verre où il n'y a pas de précipité ne filtre pas, tous les autres filtrent bien.

Dans ces filtrats nous avons étudié la réaction du biuret et nous avons dosé l'azote resté soluble.

Dans les filtrats de la deuxième série, riches en sels ammoniacaux, nous nous sommes contenté d'étudier le biuret. Dans les filtrats de la troisième série, riches en magnésie, l'addition de soude provoque la formation d'un précipité et rend le biuret d'exécution difficile, si bien que nous avons étudié :

1re série ($SO^4 Na^2$) — Biuret et azote reste soluble
2e série ($SO^4 NH^4)^2$) — Biuret
3e série ($SO^4 Mg$) — azote reste soluble.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

	1re Série Biuret	1re Série Azote soluble	2e Série Biuret	3e Série Azote soluble
1			+++	
2			++	1 mmg. 54 dans 30 cc.
3	+	1 mmg. 68 dans 40 cc.	?	1 mmg. 12 40 cc.
4	?	1 mmg. 05 50 cc.	—	0 mmg. 91 50 cc.
5	—	0 mmg. 84 60 cc.	—	0 mmg. 87 60 cc.
6	—	0 mmg. 80 70 cc.	—	0 mmg. 84 70 cc.

En nous rapportant à la réaction du biuret, nous pouvons admettre que dans le Bécher 5 de la première série, et le Bécher 4 de la deuxième série, il y a précipitation totale de la gélatine.

Pour la troisième série, nous n'avons pas ce test, mais par comparaison avec les résultats obtenus avec le sulfate de soude, nous pouvons admettre qu'au Bécher 6, la précipitation est totale.

Ceci montre que pour obtenir la précipitation complète d'une solution de gélatine à 2 % par les sels, il faut obtenir une concentration saline minima approximative de :

190 gr. °/₀₀ pour le sulfate de soude ($SO^4 Na^2$)
330 gr. °/₀₀ pour le sulfate d'ammoniaque $SO^4 (NH^4)^2$
510 gr. °/₀₀ pour le sulfate de magnésie ($SO^4 Mg\ 7\ H^2O$).

3° **Précipitation d'une solution de gélatine à 5 % par les sels.** — A 10 cc. de solution gélatinée à 5 % ajoutons goutte à goutte 10 cc. de solution saline. Au début le précipité se redissout au fur et à mesure de sa formation en se répandant dans la masse. Puis après addition de :

8 cc. 5 de solution pour le sulfate de soude
5 cc. de solution pour le sulfate d'ammoniaque

le précipité formé cesse de se redissoudre.

Avec le sulfate de magnésie, il faut ajouter 11 cc. de solution pour obtenir la persistance du précipité.

Cette expérience montre que les quantités de solution saline nécessaires pour obtenir la précipitation commençante sont plus faibles pour les solutions concentrées de gélatine que pour les solutions diluées.

Voyons maintenant pour quelles concentrations salines la précipitation devient complète.

Reprenons l'expérience faite avec les trois séries de 6 Béchers en remplaçant la solution gélatinée à 2 % par la solution à 5 %,

Etudions la réaction du biuret et dosons l'azote resté soluble comme précédemment.

	1er Série (SO^4Na^2)		2e Série ($SO^4(HN^4)^2$)	3e Série (SO^4Mg)
	Biuret	azote soluble	biuret	azote soluble
1	Ne filtre pas		+++	Ne précipite pas
2	Ne filtre pas		++	2 mmg. 52 dans 30 cc.
3	+	2 mmg. 35 dans 40 cc.	?	1 mmg. 68
4	?	1 mmg. 40 dans 50 cc.	—	1 mmg. 54
5	—	0 mmg. 84	—	1 mmg. 37
6	—	0 mmg. 80	—	0 mmg. 90

La précipitation totale de la solution à 5 % est atteinte pour les mêmes concentrations salines que la précipitation de la solution à 2 %.

4° Précipitation de la gélatine par les sels en milieu acide et en milieu alcalin. — Soit trois séries de 5 Béchers numérotés de 1 à 5 dans chaque série, contenant chacun 5 cc. de solution gélatinée à 10 %.

Ajoutons dans chaque série :

En 1	5 cc. de SO^4H^2N
2	5 cc. de $SO^4H^2N/10$
3	5 cc. d'eau distillée
4	5 cc. de NaOH N/10
5	5 cc. de NaOH N.

Ajoutons :

Dans les verres de la première série 50 cc. de solution de sulfate de soude, de la deuxième série 40 cc. de solution de sulfate d'ammoniaque, de la troisième série 60 cc. de solution de sulfate de magnésie.

Pour la première série, étudions biuret et azote soluble. Pour la seconde série, Biuret. Pour la troisième série : azote soluble.

	pH des filtrats	1re série (SO^4Na^2)	2e série ($SO^4(NH^4)^2$)	3e série (SO^4Mg)
		Biuret — N soluble	Biuret	N soluble
1	1,5	— 0 mmg. 98	—	0 mmg. 98
2	4	— 0 mmg. 84	—	0 mmg. 98
3	6,5	— 0 mmg. 84	—	0 mmg. 98
4	8,5	— 0 mmg. 84	—	0 mmg. 98
5	11	— 0 mmg. 98	—	1 mmg. 05

La précipitation est très peu sensible aux variations du pH, elle semble légèrement retardée aux pH extrêmes.

5° **Conclusions.** — Ces expériences nous montrent que la gélatine est précipitée de ses solutions aqueuses par les sulfates de soude, d'ammoniaque et de magnésie.

La précipitation ne commence que lorsque le sel atteint, au sein de la solution, une certaine concentration variable avec la concentration de la solution gélatineuse.

La précipitation totale de la gélatine exige une concentration saline minima qui est approximativement de :

190 °/oo pour le sulfate de soude ($SO^4 Na^2$)
320 °/oo pour le sulfate d'ammoniaque ($SO^4 (NH^4)^2$)
510 °/oo pour le sulfate de magnésie ($SO^4Mg, 7H^2O$).

La précipitation est très peu sensible aux variations de pH de milieu.

Le précipité obtenu est facilement soluble dans l'eau ou une solution saline diluée.

Conclusions à la seconde partie.

A la suite de ces diverses expériences nous pouvons résumer ainsi l'action des agents de précipitation étudiés.

On peut précipiter totalement la gélatine de ses solutions avec l'alcool, l'acétone et les solutions concentrées de sulfate de soude, de sulfate d'ammoniaque ou de sulfate de magnésie.

Pour obtenir la précipitation totale de la gélatine par l'alcool, il faut :

a) *Opérer au voisinage de pH 4,7*, point isoélectrique de la gélatine ;

b) *Atteindre un titre alcoolique final, 80° environ* ;

c) *Eviter la présence en quantités notables de certains sels*, tels : NaCl, $MgCl^2$, $CaCl^2$.

Avec l'acétone, il suffit :

d'opérer au voisinage de pH 4,7 ;

d'atteindre une concentration en acétone de 75 %.

La précipitation n'est pas influencée par la présence de sels minéraux.

Pour obtenir la précipitation totale de la gétaline par les sels, il suffit d'obtenir une concentration saline finale de :

190 °/oo pour le sulfate de soude (anhydre).
320 °/oo pour le sulfate d'ammoniaque cristallisé.
510 °/oo pour le sulfate de magnésie cristallisé.

La précipitation de la gélatine par les sels n'est pas influencée par le pH du milieu.

TROISIÈME PARTIE

Précipitation de la gélatine par les désalbuminants acides.

SOMMAIRE :

CHAPITRE I. — La désalbumination acide.

CHAPITRE II. — Précipitation de la gélatine par l'acide métaphosphorique.

CHAPITRE III. — Précipitation de la gélatine par l'acide trichloracétique.

CHAPITRE IV. — Précipitation de la gélatine par l'acide tungstique.

CHAPITRE V. — Précipitation de la gélatine par l'acide phosphotungstique.

CHAPITRE VI. — Conclusions. Applications au dosage.

CHAPITRE PREMIER

La désalbumination acide.

Beaucoup de protéines sont précipitées de leurs solutions par les acides et de là naquit cette conception que « les acides précipitent les protéines parce qu'ils abaissent le pH du milieu au-dessous du point isoélectrique de la protéine ».

Cette conception fut rapidement mise en défaut et nous savons maintenant qu'au-dessous du point isoélectrique les protéines libèrent des cations capables de se combiner à l'anion acide pour donner un sel. Suivant que ce sel est insoluble, ou soluble, il y aura précipitation ou non, si bien que l'on peut définir ainsi le désalbuminant acide : « C'est un acide qui réagit sur les protéines à un pH inférieur au point isoélectrique pour donner des sels de protéines insolubles. (Cristol.) Certaines protéines ne donnent que très peu de sels solubles avec les acides (Phosphates), aussi elles sont précipitées par la plupart des acides usuels. Souvent aussi l'action de l'acide provoque dans la molécule une transformation profonde et la neutralisation de l'acide employé ne ramène plus la solution à son point initial.

La gélatine au contraire donne, avec les acides, un grand nombre de sels solubles : aucun des acides usuels, acides sulfurique, chlorhydrique, nitrique, acétique ne la précipite, par contre elle est précipitée de ses solutions par les acides métaphosphorique, trichloracétique, tungstique, etc...

Nous avons limité notre étude aux acides :

Métaphosphorique,
Trichloracétique,
Tungstique,
Phosphotungstique,

qui sont les désalbuminants acides les plus couramment employés en analyse.

CHAPITRE II

Précipitation de la gélatine par l'acide métaphosphorique.

1° Généralités. 2° Précipitation d'une solution gélatinée quelconque par l'acide métaphosphorique. 3° Quantité de métaphosphate de soude nécessaire à la précipitation. 4° Influence de la concentration de la solution gélatinée. 5° Action de la dilution du milieu. 6° Action du de l'acidité du milieu et de la nature de l'acide. 7° Action du salage milieu. 8° Conclusions.

1° **Généralités.** — L'emploi de l'acide métaphosphorique comme défécant des liquides biologiques a été préconisé dans un grand nombre de dosages, mais son utilisation est restée assez restreinte, car on lui a reproché de donner des précipitations incomplètes.

C'est Denigès qui a utilisé le premier les propriétés désalbuminantes de cet acide, dans le dosage du lactose du lait. L'acide métaphosphorique étant instable, il a employé la solution aqueuse de métaphosphate de soude, beaucoup plus stable en opérant ainsi :

Lait.....	10 cc.
Métaphosphate de Na à 5 °/₀.....	5 cc.
SO^4H^2 N/10.....	10 cc.
Eau..... q. s. p.	100 cc.

Grigault et Zizine ont préconisé l'emploi de cet acide pour la défécation du sang, des liquides pathologiques et du liquide

céphalo-rachidien. Pour le sang et les liquides pathologiques, ils indiquent la technique suivante :

Sérum ou liquide pathologique.....	10 cc.
Eau.....	6 cc.
Métaphosphate de Na à 20 %.....	2 cc.
HCl 2N.....	2 cc.

On obtient ainsi un filtrat représentant la moitié de son volume de sérum. Pour le L. C.-R., ils ont proposé la technique :

L. C.-R.....	10 cc.
Métaphosphate à 20 %.....	0 cc. 5
HCl 2N.....	0 cc. 5

Ces auteurs ont étudié l'action de la dilution et l'action de l'acidité du milieu sur cette précipitation. Ils ont remarqué que le taux des substances azotées non protéiques contenues dans le filtrat métaphosphorique est d'autant moins élevé que la dilution préalable du milieu est plus grande, et ils ont montré d'autre part que pour avoir une bonne précipitation il était nécessaire d'obtenir une acidité minimum, tandis que pour une acidité plus forte les albumines apparaissent de nouveau dans le filtrat. On a atteint l'acidité maximum.

Nos expériences ont eu pour but d'étudier la précipitation de la gélatine par l'acide métaphosphorique. Lorsqu'on fait varier les conditions chimiques du milieu, acidité, concentration, etc...

2° **Précipitation d'une solution gélatinée quelconque par l'acide métaphosphorique**. — A 10 cc. d'une solution de gélatine à 2 %, ajoutons 5 cc. d'une solution de métaphosphate de soude à 5 % et 10 cc. de SO^4H^2 N/10, on obtient un précipité s'agglomérant facilement par agitation en une masse molle, collante, surmontant un liquide clair facile à séparer du précipité par simple filtration au papier. En changeant les proportions relatives de chacune des substances en présence, nous avons obtenu des précipitations irrégulières.

Ainsi en mettant dans un tube à essai 10 cc. de solution gélatinée à 5 %, 2 cc. de métaphosphate de soude à 10 % et 1 cc. de SO^4H^2 N, nous n'obtenons pas de précipité, mais il suffit d'ajouter un peu d'eau, de façon à augmenter la dilution des corps réagissants pour voir le précipité apparaître. Nous voyons par là que lorsque les corps réagissants sont à une forte concentration, la précipitation n'a pas lieu.

3° **Quantité de métaphosphate de soude nécessaire à la précipitation.** — *Expérience* : Prenons 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10.

Dans chacun mettons 10 cc. de solution gélatinée à 5 % et 10 cc. de SO^4H^2 N/10.

Puis respectivement dans les tubes :

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
4,9	4,8	4,6	4,5	4	3	2,5	2	1		cc. d'eau distillée puis
0,1	0,2	0,4	0,5	1	2	2,5	3	4	5	cc. de métaphosphate à 10 %.

Nous obtenons ainsi une série de tubes dont le contenu ne diffère que par la quantité de métaphosphate de soude.

Agitons soigneusement chacun des tubes, les tubes 1 et 2 sont restés parfaitement clairs. Le tube 3 est fortement trouble.

Par agitation, le trouble s'agglomère en un précipité qui monte à la partie supérieure du tube, surnageant un liquide clair qui se prend en gelée par refroidissement : donc ce liquide est encore riche en gélatine. Dans le tube 4, nous obtenons un précipité abondant s'agglomérant bien par agitation et facile à séparer du liquide sous-jacent par simple filtration.

Dans tous les autres tubes nous obtenons une précipitation abondante et après agitation un liquide clair surmonté d'un précipité.

Dosons l'azote resté en solution dans chaque tube et étudions le biuret.

Nous avons dosé N contenu dans 5 cc. de filtrat par la

méthode de Kjeldalh et nous avons rapporté les résultats à 25 cc. de liquide.

4	Biuret	++	il reste	13 mmg. 3	de N soluble.
5	»	++	»	3 mmg. 5	»
6	»	++	»	4 mmg. 2	»
7	»	++	»	5 mmg. 12	»
8	»	++	»	6 mmg. 3	»
9	»	++	»	9 mmg. 1	»
10	»	++	»	12 mmg. 6	»

La prise d'essai, 10 cc. de gélatine à 5 %, contient 71 mmg d'azote.

Nous voyons par là que la précipitation de la gélatine par l'acide métaphosphorique exige une certaine quantité de métaphosphate, mais qu'un excès de métaphosphate augmente la quantité d'azote restée en solution. De plus, nous pouvons remarquer que la réaction du biuret est positive avec tous les filtrats.

4° **Influence de la concentration de la solution gélatinée.** — Recommençons l'expérience précédente en remplaçant les 10 cc. de solution gélatinée à 5 % par 10 cc. de solution gélatinée à 2 %.

Dans les tubes 1 et 2 il n'y a pas de précipitation. En 3 il se produit une précipitation abondante et dans tous les autres tubes de même. Filtrons, dosons N et étudions le biuret.

Prise d'essai : 10 cc. de solution gélatinée à 2 %, soit 28 mmg. 4 de N. —

Nous avons trouvé :

3	Biuret	++	il reste	1 mmg. 19	de N soluble
4	»	+	»	1 mmg. 12	»
5	»	++	»	1 mmg. 26	»
6	»	++	»	2 mmg. 10	»
7	»	++	»	2 mmg. 45	»
8	»	++	»	2 mmg. 87	»
9	»	++	»	3 mmg. 92	»
10	»	++	»	4 mmg. 13	»

Reprenons cette expérience en mettant 10 cc. de solution gélatinée à 10 %.

Les tubes 1 et 2 ne se troublent pas. Le tube 3 est un peu trouble mais se prend très vite en gelée.

Dans le tube 4 il se produit un précipité abondant s'agglomérant bien, mais le liquide sous-jacent ne filtre pas et se prend en gelée par refroidissement.

Dans le tube 5 il se produit également un précipité abondant, mais le liquide ne filtre pas.

Dans tous les autres tubes, le précipité a pu être séparé facilement du liquide. Nous avons dosé l'azote resté soluble et étudié le biuret.

La prise d'essai : 10 cc. de solution à 10 % contient 143 mmg. de N.

en 6	Biuret	++	il reste	5 mmg. 60 de N	soluble
7	»	++	»	4 mmg. 90	»
8	»	++	»	5 mmg. 25	»
9	»	++	»	7 mmg.	»
10	»	++	»	12 mmg. 6	»

Cette expérience nous montre que la précipitation optima a lieu avec :

0 gr. 05	de métaphosphate de Na	pour 100 cc.	de solution	à	2 %
0 gr. 10	»	»	»	»	5 %
0 gr. 25	»	»	»	»	10 %

5° **Action de la dilution du milieu.** — Nous avons vu ci-dessus (§ 2) que lorsque la concentration des corps mis en présence est trop forte, la précipitation ne se produit pas.

Ainsi, si nous mettons dans un tube 5 cc. de gélatine à 10 %, 1 cc. de SO^4H^2 N/10 et 1 cc. de métaphosphate à 10 %, il ne se produit pas de précipitation. Mais par dilution on peut faire apparaître la précipitation.

Ajoutons par exemple 13 cc. d'eau de façon à obtenir un volume final de 20 cc. Après agitation, filtrons et dosons N resté soluble, nous trouvons qu'il reste 3 mmg. 57 d'azote dans 20 cc. de solution.

Recommençons l'expérience en augmentant la dilution. En diluant à 25 cc,, nous avons trouvé 3 mmg. 50 d'azote resté soluble, en diluant à 30 cc. nous avons trouvé qu'il

restait 3 mmg. 07 d'azote dans les 30 cc. et en diluant à 40 cc. nous avons trouvé qu'il restait 2 mmg. 98 d'azote.

Nous voyons là que la réaction est plus complète aux grandes dilutions, comme l'ont montré Grigault et Zizine pour les albumines du sérum sanguin.

6° **Action de l'acidité du milieu et de la nature de l'acide.** — Soit 5 tubes a essai numérotés de 1 à 5. Dans chacun, nous mettons 10 cc. de solution gélatinée à 10 %, et respectivement :

0 cc. 2 0 cc. 5 1 cc. 1 cc. 5 2 cc. de SO^4H^2N

Nous ajoutons dans chacun une quantité suffisante d'eau pour obtenir 24 cc. puis 1 cc. de métaphosphate de soude à 10 %. Dans le tube 2 il ne se produit pas de précipité.

Dans les 4 autres tubes, la précipitation se fait bien. Nous agitons, filtrons et dosons N.

La prise d'essai contient 71 mmg. de N.

en 2	il reste	6 mmg. 30	d'azote	en solution
3	»	3 mmg. 50	»	»
4	»	5 mmg. 47	»	»
5	»	6 mmg. 37	»	»

Nous voyons que la quantité d'azote soluble passe par un minimum et augmente ensuite quand l'acidité croît. En 1, l'acidité obtenue est insuffisante pour amener la précipitation. En 2, il reste encore une quantité notable d'azote. Puis cette quantité d'azote resté soluble diminue, passe par un minimum et augmente pour des acidités plus fortes.

En mesurant le pH des divers filtrats nous avons remarqué que la précipitation optima avait lieu pour pH 1,2.

Action de la nature de l'acide. — Grigault et Zizine préconisant l'emploi de l'acide chlorhydrique, nous avons cherché si son action différait de celle de l'acide sulfurique et nous avons repris l'expérience précédente en remplaçant SO^4H^2N par HCl N.

Dans le premier tube, la précipitation ne se produit pas. Dans les 4 autres, elle se fait bien. Après agitation et filtration, nous avons dosé N resté soluble et nous avons trouvé :

2	Biuret	++	il reste	4 mmg. 2 de N soluble
3	»	++	»	3 mmg. 5
4	»	++	»	6 mmg. 3
5	»	++	»	7 mmg. 70

Nous voyons par là que l'acide chlorhydrique produit bien la précipitation, mais l'excès d'acide chlorhydrique est plus gênant que l'excès d'acide sulfurique car il entraîne davantage d'azote en solution.

7° **Action du salage du milieu.** — Ces expériences nous montrent que la précipitation de la gélatine par l'acide métaphosphorique exige, pour bien se réaliser, des conditions assez précises d'acidité, de concentrations des corps réagissants, etc... Nous avons observé que la précipitation optima se faisait au voisinage de pH 1,2 (1 cc. de solution acide N dans 25 cc. de liquide).

Les sels d'acides moyens ou faibles entravant l'abaissement du pH, retardent la précipitation. Par exemple à 5 cc. de solution gélatinée à 5 % ajoutons 2 cc. de solution M/5 d'acétate de soude, 1 cc. de métaphosphate à 10 % et 10 cc. d'eau pour avoir une bonne dilution. Ajoutons goutte à goutte SO^4H^2 N/10, la précipitation ne commence que lorsque tout l'acétate est transformé en acide acétique. Mais les sels d'acides forts sont également capables d'empêcher la précipitation. Prenons :

5 cc. de solution gélatinée à 5 %,
5 cc. de bromure de K à 10 %,
1 cc. de PO^3 Na à 10 %.

Ajoutons 5 cc. de SO^4H^2N/10, il ne se produit pas de précipité, bien que le pH soit suffisamment abaissé. Dans un tube témoin, où nous avons mis 5 cc. d'eau distillée au

lieu de bromure de potassium, la précipitation se fait normalement.

Ajoutons 10 cc. d'eau distillée, la précipitation ne se fait pas, mais en continuant on fait apparaître le précipité.

De même le chlorure de magnésium, le phosphate de soude et un grand nombre de sels empêchent la précipitation, même si l'acidité ionique du milieu est suffisante.

Le métaphosphate de soude en excès agit lui-même comme un sel neutre ; c'est pourquoi il faut éviter de l'employer en excès.

8° **Conclusions.** — *L'acide métaphosphorique peut précipiter la gélatine de ses solutions diluées ou concentrées*, mais cette précipitation exige des conditions de milieu bien définies.

1° *La précipitation n'est jamais totale quels que soient :*

Le pH du milieu ;

L'acide employé ;

La dilution sous laquelle réagissent les substances en présence.

2° *La précipitation optima exige :*

Un pH déterminé voisin de 1,2 ;

Une dilution suffisante ;

Un rapport sensiblement constant entre la quantité de gélatine à précipiter et celle du précipitant.

Cette précipitation n'a pas lieu dans une solution fortement chargée en sels minéraux.

CHAPITRE III

Précipitation de la gélatine par l'acide trichloracétique.

1° Généralités. 2° Concentration acide nécessaire à une précipitation commençante. 3° Quantité d'azote restant soluble aux diverses concentrations acides. 4° Variation de la quantité d'azote soluble avec la concentration de la solution gélatinée. 5° Conclusions.

1° **Généralités.** — L'acide trichloracétique en solution à 20 % est aujourd'hui le désalbuminant le plus couramment utilisé en chimie biologique. Il précipite la totalité des albumines, mais laisse passer à travers les filtres la totalité des polypeptides. On l'utilise en ajoutant au liquide à déféquer un volume égal de solution acide à 20 % : c'est la défécation à acidité forte (technique de Moog). On emploie également la solution à 8 %, c'est la défécation à acidité faible. Goiffon emploie une solution à 3 % et défèque le sérum sanguin pour le dosage colorimétrique des polypeptides (index tyrosine) avec :

Sérum	1 cc.
Sol acide	9 cc.

Cristol et Nicholitch, en étudiant l'action de l'acide trichloracétique à diverses concentrations sur le sérum sanguin, ont remarqué que la quantité d'azote restant dans le filtrat passait par deux maxima pour les concentrations de 8 % et 50 %, et présentait un palier entre les concentrations de 10 % et 30 %. (Voir page 87, courbe IV.)

Grienfagen et Scholl ont utilisé l'acide trichloracétique pour séparer la gélatine des protéoses utilisant la propriété de celles-ci d'être plus facilement précipitées par l'acide trichloracétique que la gélatine : la précipitation de la gélatine par l'acide trichloracétique exige des concentrations acides élevées.

Nous nous sommes proposé d'étudier cette précipitation et de rechercher les concentrations acides qu'il était nécessaire d'obtenir pour avoir :

a) Une précipitation commençante ;

b) Une précipitation totale.

Et nous avons étudié en même temps la quantité d'azote resté en solution pour les diverses concentrations acides.

2° **Concentration acide nécessaire à une précipitation commençante.** — Si dans une solution d'acide trichloracétique à 20 % on laisse tomber une goutte de sérum sanguin, ou une goutte de solution gélatinée à 5 % ou à 10 %, il se produit dans les deux cas une précipitation de la matière protéique. Lorsqu'on fait tomber goutte à goutte de l'acide trichloracétique dans du sérum sanguin, chaque goutte acide qui tombe forme un précipité qui se répand dans la masse sans se dissoudre.

Si, au contraire, on ajoute à une solution de gélatine de l'acide trichloracétique à 20 %, chaque goutte d'acide en tombant forme un précipité qui se redissout dans l'excès de gélatine. Cette redissolution se fait jusqu'à ce que l'acide ait atteint au sein du liquide une certaine concentration.

Expérience. — Dans un tube à essai plaçons 10 cc. de solution de gélatine à 2 %. A l'aide d'une burette graduée ajoutons de l'acide trichloracétique à 20 % en agitant soigneusement après addition de chaque goutte. Il nous a fallu ajouter 3 cc. 2 de solution acide pour avoir un trouble persistant.

Cette quantité d'acide est variable avec la concentration de la solution gélatinée, comme le montre l'expérience suivante.

Expérience. — Dans 6 tubes à essais numérotés de 1 à 6, nous avons mis respectivement :

Solution gélatinée à 10 % :

2 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.	8 cc.	10 cc.

et eau distillée

8 cc.	6 cc.	5 cc.	4 cc.	2 cc.	0

Nous obtenons ainsi dans chaque tube 10 cc. de solution gélatinée de concentration

2 %	4 %	5 %	6 %	8 %	10 %

Dans chaque tube nous avons ajouté de l'acide trichloracétique à 20 %, jusqu'à obtention du trouble persistant, il nous a fallu ajouter respectivement :

3 cc. 2	3 cc. 3	3 cc. 4	3 cc. 5	3 cc. 6	3 cc. 6

Donc pour que la précipitation commence, il faut que la concentration de l'acide atteigne une certaine valeur au sein du liquide. Cette valeur est variable avec la concentration de la solution gélatinée ; elle doit atteindre 4 g. 8 % pour une solution de gélatine à 2 % et 5 g. 30 % pour une solution de gélatine à 10 %. Seule la concentration en acide libre importe et les alcalis retardent d'autant l'apparition du précipité.

Si, lorsque ce trouble est atteint, nous continuons à ajouter de l'acide, le trouble s'épaissit, il se forme un précipité abondant.

Continuons à ajouter de l'acide jusqu'à addition d'un volume égal à celui de la solution gélatinée. Agitons violemment, le précipité s'agglomère en une masse visqueuse à la partie supérieure du tube à essai, laissant au-dessous un liquide clair. Jetons sur un filtre, la filtration est rapide et donne un liquide parfaitement limpide. Cependant la précipitation est incomplète.

Le filtrat neutralisé donne un précipité par le tanin et une réaction du biuret positive.

3° **Quantité d'azote restant soluble aux diverses concentrations acides.** — *Expérience.* — Dans 5 tubes à essais numérotés de 1 à 5, mettons :

Gélatine à 10 % 5 cc.

et respectivement :

Eau distillée.....	4	3	2	1	0
Acide trichloracétique au 1/3...	1	2	3	4	5

Nous avons ainsi dans chaque tube la même quantité de gélatine, le même volume final, et les concentrations en acide trichloracétique sont de :

1/30 1/15 1/10 2/15 1/6

Dans le tube 1 il n'y a pas de précipitation. Le contenu des autres tubes est filtré et nous dosons N resté soluble dans chaque filtrat.

Les chiffres d'azote sont rapportés à 10 cc.

La prise d'essai contient 71 mmg. de N.

En 2	il reste	49 mmg.	de N soluble
3	»	14 mmg. 48	»
4	»	2 mmg. 57	»
5	»	1 mmg. 68	»

Sur chaque filtrat, nous avons fait, après neutralisation, la réaction du biuret. Nous l'avons obtenue positive dans les 4 premiers tubes et douteuse dans le tube 5.

Nous avons poursuivi l'expérience par de très fortes concentrations en acide trichloracétique.

Dans les tubes 6, 7, 8 et 9, nous mettons 10 cc. de solution gélatinée à 10 %.

En 6	nous mettons	10 cc. d'acide trichloracétique au 1/2
7		15 cc.
8		20 cc.
9		30 cc.

Après agitation, nous filtrons et nous dosons N sur 10 cc. de filtrat.

En 6	il reste	0 mmg. 87	de N	dans	10 cc.	de filtrat
7	»	0 mmg. 70	»	»	»	
8	»	0 mmg. 91	»	»	»	
9	»	1 mmg. 05	»	»	»	

Nous voyons que pour les très fortes concentrations acides, la quantité d'azote restée soluble croît.

Sur chacun de ces filtrats neutralisés nous avons fait la réaction du biuret ; nous l'avons obtenue négative dans tous.

4° **Variation de la quantité d'azote soluble avec la concentration de la solution gélatinée.** — Refaisons l'expérience précédente en employant une solution gélatinée à 5 %.

En dosant N dans les filtrats nous avons obtenu :

En 2	il reste	26 mmg. 6	de N soluble	dans	10 cc.	de filtrat
3	»	7 mmg. 28	»	»	»	
4	»	1 mmg. 70	»	»	»	
5	»	0 mmg. 85	»	»	»	
6	»	0 mmg. 51	»	»	»	
7	»	0 mmg. 44	»	»	»	
8	»	0 mmg. 53	»	»	»	
9	»	0 mmg. 65	»	»	»	

Avec une solution gélatinée à 2 %, nous avons obtenu les chiffres suivants :

Prise d'essai		14 mmg. 2				
En 2	il reste	9 mmg. 80	de N soluble	dans	10 cc.	de filtrat
3	»	2 mmg. 77	»	»	»	
4	»	0 mmg. 23	»	»	»	
5	»	0 mmg. 27	»	»	»	
6	»	0 mmg. 16	»	»	»	
7	»	0 mmg. 16	»	»	»	
8	»	0 mmg. 19	»	»	»	
9	»	0 mmg. 23	»	»	»	

Si pour chaque essai nous rapportons la quantité d'azote resté soluble à la quantité d'azote, nous obtenons le tableau suivant :

Nos des essais	Concentration finale en acide	Azote soluble pour cent d'azote total		
		gélatine à 10 %	gélatine à 5 %	gélatine à 2 %
2	6,66 %	69	74	69
3	10	20	20	19
4	13,3	3,6	4,7	3,7
5	16,6	2,3	2,3	1,9
6	25	1,2	1,4	1,1
7	30	1,2	1,5	1,4
8	33	1,9	2,2	2
9	37,5	2,9	3,6	3,2

Le tableau ci-dessus nous montre :

1° Que la quantité d'azote restée dans le filtrat est proportionnelle à la quantité d'azote mise en œuvre pour des concentrations équivalentes en acide trichloracétique.

2° La quantité d'azote restée soluble décroît quand la concentration en acide trichloracétique croît, passe par un minimum et croît ensuite pour les très fortes concentrations en acide.

Ceci s'oppose à ce qui se produit avec les albumines sériques. Cristol, en étudiant l'action de l'acide trichloracétique à diverses concentrations sur le sérum sanguin, a formulé les conclusions suivantes :

« Si l'on défèque le même sérum par l'acide trichloracétique à des concentrations croissant de 8 % à 50 %, on assiste au phénomène suivant : la valeur de l'azote total non protéique passe par deux maxima à 8 et 50 % Il est bon de remarquer que dans le premier cas la désalbumination est complète au sens où nous l'entendons aujourd'hui. A partir de 10 %, les chiffres augmentent progressivement, toutefois de 10 % à 30 % la courbe affecte la forme d'un palier avec des variations de 2 à 3 ctg... (Voir courbe IV, p. 87.)

Si sur ce même graphique nous traçons la courbe que donne l'azote resté soluble en traitant de la gélatine par de

l'acide trichloracétique et à différentes concentrations, nous remarquons l'opposition qu'il y a entre ces deux courbes.

Cet azote restant, tient-il à de la gélatine non précipitée, ou à des produits d'hydrolyse. L'expérience suivante nous montre qu'il reste de la gélatine en solution après précipitation avec l'acide trichloracétique à 20 %.

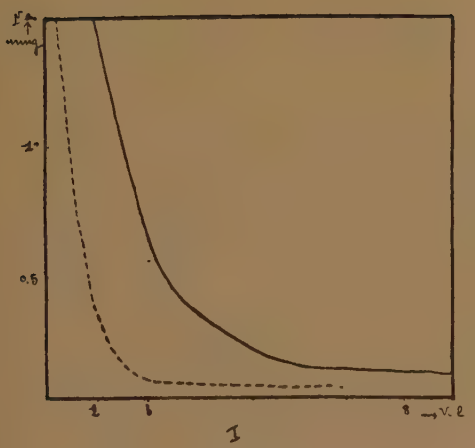
Expérience. — Ajoutons 100 cc. d'acide trichloracétique à 20 %, à 100 cc. de solution gélatineuse à 10 %. Agitons. Filtrons. Après avoir neutralisé le filtrat, amenons-le à pH. 4,7 par addition de solution tampon et ajoutons 5 volumes d'alcool à 96. Après séparation du précipité formé, dissolvons-le dans 20 cc. d'eau distillée. En opérant ainsi nous avons obtenu 20 cc. de solution faisant légèrement prise par refroidissement et contenant 89 mmg. d'azote total.

A 10 cc. de cette solution, ajoutons 10 cc. d'acide trichloracétique à 20 %, nous obtenons un précipité représentant 9 mmg. 5 d'azote ; il reste 35 mmg. d'azote en solution.

Une solution de gélatine ordinaire ainsi traitée donne un précipité représentant sensiblement les 4/5 de l'azote total (voir tableau page 85, essai 3). Une solution de gélatine qui, additionnée de son volume d'acide trichloracétique à 20 %, donnerait un précipité représentant 9 mmg. 5 d'azote, contiendrait donc sensiblement $\frac{9,5 \times 5}{4}$ mmg. d'azote total, soit 11 mmg. 87.

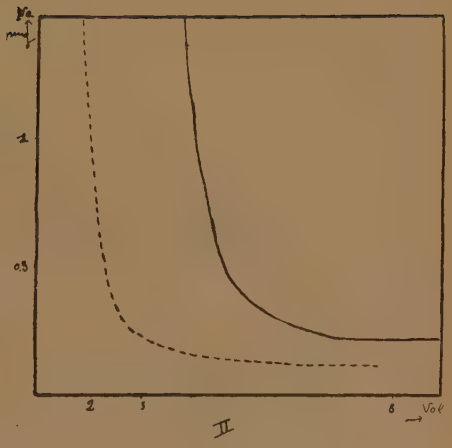
Or les 10 cc. de solution traitée contiennent 44 mgr. 5 d'azote total. Nous pouvons admettre que sur les 44 mgr. 5 d'azote, 11 mmg. 87 appartiennent à de la gélatine et fournissent par traitement à l'acide trichloracétique un précipité représentant les 4/5 de cet azote, soit 9 mgr. 5, et le reste, soit 32 mgr. 53, appartient à des produits d'hydrolyse.

5° **Conclusions.** — L'acide trichloracétique précipite la gélatine de ses solutions étendues ou concentrées, mais cette précipitation exige pour être totale de très fortes concentrations acides ; il reste toujours un peu d'azote en solution.



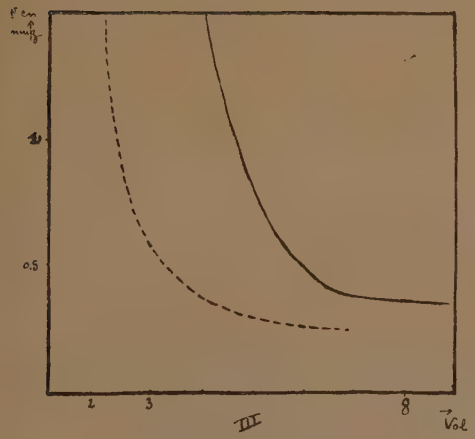
I

Gélatine à 2 %



II

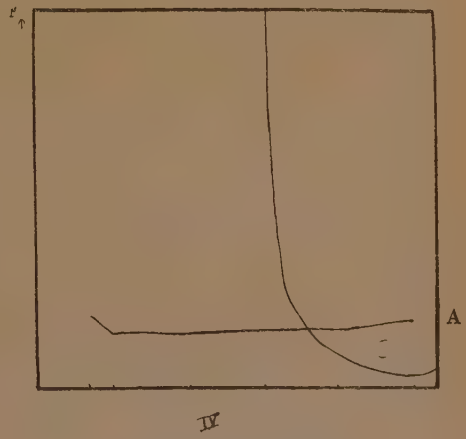
Gélatine à 5 %



III

Gélatine à 10 %

B



IV

Acide trichloracétique

A sérum sanguin (d'après Cristol)

B gélatine

- - - - - Acétone

——— Alcool

CHAPITRE IV

Précipitation de la gélatine par l'acide tungstique.

1° Généralités. 2° Quantité d'acide tungstique nécessaire à la précipitation. 3° Influence de la concentration de la gélatine. 4° Action de l'acidité du milieu. 5° Action des sels sur cette précipitation. 6° Conclusions.

1° **Généralités**. — L'acide tungstique a été employé comme défécant du sérum sanguin par Folin et Wu. Il précipite la totalité des albumines, les albumoses peptones et polypeptides. C'est un des meilleurs désalbuminants : les filtrats tungstiques sont les moins chargés en azote résiduel.

On l'emploie en général suivant la technique indiquée par Cristol.

Sérum.....	1 vol.
Eau distillée.....	2 vol.
Tungstate de soude à 10 %.	1 vol.
SO^4H^2 N /3.....	1 vol.

Lorsqu'on traite une solution de gélatine suivant cette technique, on obtient un précipité blanc abondant. Si on agite, le précipité s'agglomère en une masse molle d'aspect visqueux. Jetons sur un filtre, on a une filtration rapide et un filtrat bien limpide. Le précipité obtenu est facilement soluble dans les alcalis, mais il n'est pas soluble dans l'eau distillée froide.

Nous avons étudié cette précipitation en faisant varier

les quantités relatives des divers éléments réagissants et leur concentration.

2° **Quantité de tungstate nécessaire à la précipitation.** — *Expérience.* — Dans 4 tubes numérotés de 1 à 4, plaçons 5 cc. de solution gélatinée à 10 % (1 solution gélatinée à 10 % présente à peu près la même concentration en matière protéique que le sérum sanguin.)

En I mettons	12 cc.	d'eau et	3 cc.	de tungstate à 10 %
II	11 cc.	»	4 cc.	»
III	10 cc.	»	5 cc.	»
IV	5 cc.	»	10 cc.	»

et dans chacun 5 cc. de SO^4H^2 2 N/3

Nous obtenons 5 tubes contenant la même quantité de gélatine, d'acide et le même volume d'eau.

Il se produit:

En I, une précipitation abondante, mais le liquide filtre mal. Au filtrat ajoutons un peu de tungstate, il y a encore précipitation. Donc la précipitation est incomplète.

Dans les 3 autres tubes la précipitation se fait bien, le précipité est facile à séparer du liquide par filtration. Les filtrats donnent une réaction du biuret négative et ne contiennent pas d'azote.

En IV, l'excès notable du tungstate resté en solution constitue un obstacle aux recherches ultérieures, dosage de N par exemple, mais ne gêne pas la précipitation.

L'expérience montre que 3 cc. de tungstate à 10 % dans 25 cc. de liquide sont insuffisants pour précipiter complètement 0 g. 5 de gélatine (5 cc. de solution à 10 %) contenus dans ces 25 cc., il faut au moins 4 cc. de tungstate à 10 % pour obtenir la précipitation totale.

Voyons maintenant ce qui se passe si nous faisons varier la quantité de gélatine.

3° **Influence de la concentration en gélatine.** — *Expérience.* Prenons 3 tubes à essai de 30 cc., et mettons dans chacun 10 cc. de gélatine à 10 %.

Dans le 1er ajoutons : 4 cc. d'eau distillée, 6 cc. de tungstate à 10 %.

Dans le second : 2 cc. d'eau distillée, 8 cc. de tungstate de soude à 10 %.

Dans le troisième, 10 cc. de tungstate à 10 %.

Puis nous ajoutons dans chacun 5 cc. de SO^4H^2 N au lieu de $SO^4H^2 \frac{2N}{3}$ en raison des fortes quantités de tungstate employées. Dans I, il y a précipitation. Agitons et filtrons. La filtration est lente, le liquide filtré précipite par addition de tungstate, il reste de l'azote dans la solution.

Dans les deux autres, la précipitation est totale.

Cette expérience montre que la concentration de l'acide tungstique n'intervient pas seule, il y a aussi la quantité ; 3 cc. de tungstate à 10 % ne peuvent précipiter 0 gr. 50 de gélatine dans 25 cc., de même 6 cc. de tungstate à 10 % ne peuvent précipiter 1 gr. de gélatine dans le même volume.

Cas des solutions diluées de gélatine. — Prenons une solution de gélatine à 1 % et mettons :

Gélatine.....	1 vol.
Eau.....	2 vol.
Tungstate de Na à 10 %...	1 vol.
$SO^4H^2 \frac{2N}{3}$	1 vol.

Nous obtenons encore la précipitation, mais pour avoir une filtration facile, il est indispensable de bien agiter pour agglomérer le précipité ; si le filtrat est trouble, refiltrer. Dans cette expérience nous pouvons réduire la quantité de tungstate, ainsi mettons :

Gélatine à 1 %.....	10 cc.
Eau distillée.....	9 cc.
Tungstate de Na à 10 %...	1 cc.
$SO^4H^2 \frac{2N}{3}$	2 cc.

Nous obtenons encore la précipitation totale, 1 cc. de solution de tungstate à 10 % suffit pour précipiter 0 g. 01 de gélatine dans 25 cc. de solution. Si nous réduisons en même temps l'acidité du milieu, la précipitation cesse d'être com-

plète ; l'acidité du milieu est donc susceptible de modifier la précipitation.

4° **Action de l'acidité du milieu.** — Soit 4 tubes à essai numérotés de 1 à 4.

Dans chacun mettons :

5 cc. de solution gélatinée à 10 %, 10 cc. d'eau distillée, 5 cc. de tungstate de soude, puis nous ajoutons respectivement :

1	5 cc. de SO^4H^2 N/2
2	5 cc. de SO^4H^2 $\frac{2N}{3}$
3	5 cc. de SO^4H^2 N
4	5 cc. de SO^4H^2 2N

Dans tous les tubes il se produit une précipitation abondante. Après agitation, filtrons. Sur les filtrats dosons N.

En I il reste 0 mmg. 63 de N soluble.

Dans les trois autres, la précipitation est complète, il ne reste pas du tout d'azote.

Donc pour que la précipitation ait lieu, il faut que l'acidité atteigne une certaine valeur, et un excès d'acidité ne gêne pas la précipitation.

5° **Action des sels sur cette précipitation.** — Les sels neutres à anions d'acides forts n'ont aucune action sur la précipitation de la gélatine par l'acide tungstique, ceux qui gênent la précipitation sont ceux qui agissent par apport d'alcalinité, ils retardent la précipitation car ils retardent l'abaissement du pH.

6° **Conclusions.** — L'acide tungstique est un bon agent de précipitation de la gélatine.

Pour que la précipitation soit complète, il faut :

Que la *quantité de tunsgtate ajoutée soit suffisante* pour précipiter la quantité de gélatine mise en œuvre.

Que l'*acidité soit suffisante.*

Ces deux conditions étant réalisées, la précipitation se fait bien, quels que soient la concentration des corps réagissants et le degré de salage du milieu.

Le précipité obtenu est soluble dans les alcalis mais insoluble dans l'eau distillée, contrairement aux précipités obtenus avec les agents de précipitation étudiés jusqu'alors.

CHAPITRE V

Précipitation de la gélatine par l'acide phosphotungstique.

L'acide phosphotungstique jouit des mêmes propriétés désalbuminantes que l'acide tungstique, et s'emploie en concurrence avec lui, suivant une technique identique pour la défécation du sérum sanguin, soit :

Sérum sanguin	1 vol.
Eau distillée.....	2 vol.
Phosphotungstate de Na à 10 %	1 vol.
$SO^4H^2 \frac{2N}{3}$	1 vol.

On emploie également la solution d'acide phosphotungstique préparée directement. En traitant une solution de gélatine suivant la technique indiquée ci-dessus, on obtient un précipité grumeleux ne s'agglomérant pas par agitation et ayant tendance à se déposer au fond du liquide, tandis que les précipités obtenus à partir des autres acides étudiés sont plus cohérents, s'agglomérant facilement par agitation en une masse molle élastique, ayant tendance à surnager le liquide. Après filtration, on obtient un liquide bien limpide entièrement dépourvu de matières protéiques.

La réaction du biuret est négative.

On ne trouve pas d'azote soluble.

Nous avons étudié cette précipitation en faisant varier les proportions des divers constituants de la réaction et les conditions chimiques du milieu.

Nous avons étudié :

La quantité de phosphotungstate nécessaire à la précipitation ;

L'influence de la concentration de la solution de gélatine ;

L'action de l'acidité du milieu et l'action des sels sur cette précipitation.

En répétant point par point les expériences faites avec l'acide tungstique, les mêmes expériences nous ont conduit aux mêmes résultats. Nous avons remarqué, toutefois, qu'avec les solutions diluées de gélatine, l'acide phosphotungstique donne des précipités de séparation plus facile que ceux obtenus avec l'acide tungstique.

Le précipité obtenu par action de l'acide phosphotunstique sur la gélatine, est soluble dans les alcalis, mais n'est pas soluble dans l'eau.

CHAPITRE VI

Conclusions. Application du dosage.

1° **Conclusions.** — En étudiant l'action des désalbuminants acides sur la gélatine, nous avons vu que *la gélatine était précipitée de ses solutions par les acides métaphosphorique, trichloracétique, tungstique, phosphotungstique.*

Mais la *précipitation de la gélatine par l'acide métaphosphorique n'est jamais totale* quelles que soient les conditions du milieu.

La précipitation de la gélatine par l'acide trichloracétique exige pour être totale des concentrations acides très élevées. L'acide tungstique est un très bon précipitant, il suffit pour avoir une précipitation totale de réaliser au sein du milieu une acidité suffisante et une proportion approximative de 0 g. 1 de tungstate de soude pour 0 g. 1 de gélatine.

L'acide phosphotungstique agit comme l'acide tungstique et donne comme lui des précipitations bien complètes. En outre, avec les solutions diluées de gélatine, la séparation du précipité est en général plus facile avec l'acide phosphotungstique qu'avec l'acide tungstique. Si bien que l'acide phosphotungstique semble le précipitant de choix à employer pour la gélatine.

2° **Applications du dosage.** — Nous pouvons maintenant chercher à appliquer aux dosages les remarques que nous avons faites au cours des études précédentes. Pour séparer la gélatine des milieux où elle se trouve, nous emploierons les réactifs donnant des précipitations complètes et qui permettent de séparer facilement solutions et précipités.

L'alcool et l'acétone seront d'un emploi avantageux, en raison de leurs propriétés dissolvantes particulières. Ainsi l'alcool sera utilisé pour séparer la gélatine des milieux sucrés ou glycérinés, par exemple, de préférence à l'acétone qui est un mauvais solvant de la glycérine et des hydrates de carbone.

L'acétone sera employée avantageusement pour séparer la gélatine des milieux riches en corps gras.

L'emploi des sels présente l'inconvénient de charger les filtrats en substances dissoutes, de donner des filtrations parfois longues. Le sulfate d'ammoniaque gêne de plus tout dosage azotométrique.

L'alcool et l'acétone ont sur les sels l'avantage de leurs propriétés dissolvantes et de leur facilité d'élimination.

Les acides métaphosphorique et trichloracétique ne seront pas employés, le premier ne donne pas de précipitation complète, le second exige des concentrations acides très élevées et un filtrat fortement chargé en acide trichloracétique.

Les acides tungstique et phosphotungstique précipitent complètement la gélatine. Le précipité obtenu est facile à séparer du liquide par filtration ou centrifugation. La solubilité du précipité dans les alcalis fait que ceux-ci se prêtent bien à des dosages azotométriques, ce qui fait que ces acides seront employés avec avantage pour le dosage de la gélatine, surtout l'acide phosphotungstique qui est le précipitant de choix des solutions diluées de gélatine.

QUATRIÈME PARTIE

Dosage de la gélatine dans les substances pharmaceutiques et alimentaires.

SOMMAIRE

CHAPITRE I. — La gélatine officinale. Essai.

CHAPITRE II. — Glycérine gélatinée.

CHAPITRE III. — Sérum gélatiné.

CHAPITRE IV. — La gélatine dans les boules de gomme.

CHAPITRE V. — Recherche et dosage de la gélatine dans les gelées, les confitures et produits de confiserie.

CHAPITRE PREMIER

La gélatine officinale. Essai.

I. La gélatine dans les formulaires officiels : 1° Caractères. 2° Essai. — II. Pharmacopées étrangères. — III. Travaux de Cattelain : 1° Acidité. 2° Cendres. — IV. Recherches personnelles : 1° Teneur en eau. 2° Acidité ionique. 3° Acidité de titration. 4° Teneur en cendres. 5° Examen des cendres. 6° Recherche et dosage de SO^2. 7° Recherche sur la teneur en produits d'hydrolyse. 8° Résumé des essais. 9° Conclusions. — V. Teneur en azote de la gélatine officinale.

I. — La gélatine dans les formulaires officiels.

1° **Caractères.** — On trouve au Codex 1908 trois articles concernant la gélatine.

Le premier article (p. 319) définit ainsi la gélatine : « La gélatine est une substance amorphe solide, inodore, incolore. Elle ne se dissout pas sensiblement dans l'eau froide mais s'y gonfle seulement. Ses solutions faites avec de l'eau chaude se reprennent en gelée par refroidissement. Elles sont précipitées par le tanin, l'alcool, l'acide picrique.

Une longue ébullition des solutions de gélatine leur fait perdre la propriété de se prendre en gelée.

Les deux autres articles définissent les deux variétés de gélatine pouvant être utilisées en pharmacie.

Au deuxième article on trouve :

Gélatine officinale. Grénétine. — Cette variété de gélatine est incolore. Elle se présente en général en lames minces, flexibles, à coupure non esquilleuse. La grénétine se dissout entièrement dans l'eau chaude et la solution à 1 % se prend en gelée par refroidissement. Cette gelée est incolore, sans odeur, ni saveur.

Au troisième article :

Gélatine ordinaire. — Cette variété de gélatine ne doit être employée que pour les bains. Les meilleures sortes sont celles qui ont la cassure la plus nette, qui se dissolvent le moins dans l'eau froide, mais s'y gonflent le plus.

Le Formulaire des Hôpitaux militaires ne signale que la gélatine.

Grénétine. — Provient de l'hydratation de l'osséine des os ou des vessies natatoires de certains poissons. Lames incolores transparentes, minces, flexibles, à coupure nette non esquilleuse.

2° **Essai.** — Dans ces deux formulaires l'essai seul de la grénétine est indiqué.

Au Codex de 1908 : la solution aqueuse de grénétine doit être neutre au tournesol. Elle ne doit pas se colorer par le ferro-cyanure de potassium ou par H^2S. La grénétine incinérée ne doit pas donner plus de 2 % de son poids de cendres.

Le supplément de 1926 ajoute : « Neutre ou légèrement alcaline, l'acidité exprimée en SO^4H^2 ne devra pas dépasser 2 %. »

Le Formulaire des Hôpitaux militaires dit : « Doit se dissoudre entièrement dans l'eau chaude en donnant une solution neutre ou très légèrement acide au tournesol. La solution à 1 % doit, par refroidissement, se prendre en gelée incolore, inodore, insipide, Elle ne doit pas précipiter par les acides minéraux, les bases, le ferrocyanure de potassium acétique, l'hydrogène sulfuré.

Elle doit être exempte d'acide sulfureux que l'on recherche en distillant la gélatine en présence d'acide phosphorique et en recevant le distillat dans du chlorure de baryum iodé.

II. — Pharmacopées étrangères.

Les pharmacopées belges et britanniques ne traitent pas l'essai de la gélatine. L'essai indiqué dans la pharmacopée

suisse est un essai purement bactériologique au sujet du sérum gélatiné.

La pharmacopée allemande admet un titre en cendres de 2 % au maximum. Elle prescrit la recherche du cuivre dans les cendres par la réaction à l'ammoniaque. Elle prescrit de plus la recherche de SO^2 par distillation sur une solution d'iode et ajoute que le SO^3 formé dans cette solution doit être entièrement précipité par une quantité fixée de $BaCl^2$.

La pharmacopée des Etats-Unis fixe à 2 % la teneur maximum en cendres, et prescrit la recherche des métaux lourds dans les cendres. Elle donne de plus une technique détaillée pour la recherche de l'arsenic et pour la recherche et le dosage de SO^2.

En dehors de ces procédés officiels, les travaux de Cattelain ont apporté beaucoup de précisions à cet essai. Cattelain a étudié l'acidité et les cendres.

III. — Travaux de Cattelain.

1° **Acidité.** — Cattelain a remarqué que toutes les gélatines officinales possédaient une réaction acide très nette. Dhéré d'ailleurs avait montré qu'il en était de même pour toutes les gélatines les mieux purifiées.

Le Codex d'ailleurs a prévu cette acidité puisque dans la préparation du sérum gélatiné il prescrit de neutraliser la gélatine employée.

Cattelain a pensé qu'il y avait lieu de fixer une limite supérieure à cette acidité qu'il détermine ainsi :

10 gr. de gélatine préalablement déshydratée par un séjour à l'étuve à 100° sont mis à dissoudre dans 200 cc. d'eau chaude. On ajoute 2 gouttes de Phtaléine et on dose l'acidité par addition de soude normale.

L'acidité ne doit pas dépasser 1 gr. 50 % en HCl.

2° **Cendres.** — Les divers échantillons de gélatine qu'il a analysés ne lui ont fourni que 1 gr. 25 à 1 gr. 50 % de cendres blanches, aussi il propose l'abaissement de la

limite à 1 gr. 50 % au lieu de 2 % : « chiffre qui correspond aux gélatines commerciales mais non aux gélatines officinales ».

Cattelain a ensuite examiné les cendres du point de vue qualitatif et quantitatif, il a trouvé à titre constant :

P^2O^5, SO^3, un peu de SiO^2 et CaO, MgO, Fe^2O^3.

Il signale en outre la présence fréquente de Mn et de Cu.

Il donne comme composition moyenne de cendres :

Cendres solubles :		
	CaO	53,46
	MgO	traces
	Fe^2O^3	1,22
	P^2O^5	5.40
	SO^3	36,36
Cendres insolubles		
SiO^2		3,36
		99,80

IV. — Recherches personnelles.

1° **Teneur en eau.** — Les gélatines employées en pharmacie contiennent toujours de notables quantités d'eau. Cette teneur peut varier dans des limites assez importantes non mentionnées par le Codex qui prescrit, pour la préparation des glycérines gélatinées, l'emploi de gélatine lavée et séchée mais ne précise pas les conditions de la dessiccation.

Dhéré a signalé que les gélatines prises dans les conditions ordinaires perdent de 15 à 19 % de leur poids par dessiccation jusqu'à poids constant à 100°.

Il y a intérêt à ne pas dessécher la gélatine à une température plus élevée car la dessiccation peut alors entraîner une altération du produit.

Hofmeister a montré en 1878 que si on dessèche pendant longtemps à 130° de la gélatine, on la transforme en un produit qui ne semble pas différer du collagène. D'après Hofmeister cette transformation n'a pas lieu à une température plus basse. « Cependant, dit Dhéré, ayant desséché pendant

un ou deux jours de la gélatine à une température comprise entre 110° et 120°, nous avons toujours constaté une diminution appréciable de la solubilité. »

Pour déterminer le poids sec des gélatines étudiées, nous avons opéré ainsi : dans une capsule en porcelaine de 10 cm. de diamètre, nous avons mis 10 gr. de gélatine (ou un poids P voisin de 10 gr.) et nous avons maintenu à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant.

Avec les échantillons de gélatine étudiés, 6 gélatines en plaques et 2 gélatines en grains, nous avons obtenu des chiffres compris entre 15 gr. 96 et 21 gr. pour 100 gr. de gélatine ordinaire.

Cette quantité d'eau peut varier avec le milieu où la gélatine est conservée. C'est sans doute pourquoi le Codex indique de conserver la gélatine en vase fermé.

2° **Acidité ionique.** — Nous avons vu que toutes les gélatines même les mieux purifiées étaient acides au tournesol. Il est intéressant de savoir à quel pH se trouve une solution de gélatine. Ce pH varie avec la gélatine employée.

Nous avons déterminé le pH des solutions de gélatine à 1 %, obtenues à partir des échantillons étudiés en opérant par colorimétrie avec l'échelle suivante :

PO^4Na^2H M/15	PO^4KH^2 M/15	pH
0 cc. 25	9,75	5,29
0 cc. 50	9,5	5,50
1	9	5,90
2	8	6,23
3	7	6,46
4	6	6,64
5	5	6,81
6	4	6,98
7	3	7,16
8	2	7,38
9	1	7,73
9,5	0,5	8,04

Indicateur. — Pourpre de bromocrésol (5,2 à 6,8).

Nous avons opéré par colorimétrie à l'aide du comparateur Walpole.

Nous avons trouvé des chiffres allant de 5,3 à 6,8 (sauf un échantillon pour lequel pH = 5). Un procédé rapide, et qui peut être suffisant dans bien des cas, consiste à utiliser le colorant Guillaumin et la technique employée pour déterminer en clinique le pH urinaire.

Le colorant Guillaumin se fait avec :

Rouge de méthyle	0 gr. 125
Bromothymol bleu	0 gr. 400
NaOH N/20	19 cc.
Eau distillée, q.s.p	1000

A 10 cc. de la solution de gélatine à 1 %, on ajoute 10 gouttes de réactif et on compare la teinte obtenue avec celle d'un tableau fait à cet usage portant des teintes allant du rouge grenadine (pH 4,6) au vert végétal pH 7,4.

3° **Acidité de titration.** — Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 cc. tarée, on met un poids P de gélatine voisin de 5 gr. et on ajoute 100 cc. d'eau distillée. On fait dissoudre en chauffant légèrement sur un bain-marie et après dissolution on laisse refroidir vers 35-40°. On titre avec NaOH N/10 en présence de phtaléine. » Soit *n* cc. employés pour avoir la coloration rose :

$$\text{l'acidité en } SO^4H^2 \text{ est de } A = 0{,}49\ \frac{n}{P}\ \%.$$

$$\text{exprimée en HCl elle est de } (0{,}365\ \frac{n}{P}\ \text{en HCl } \%).$$

P représente le poids de la prise d'essai. Connaissant la teneur en eau on peut en déduire le poids *p* de gélatine sèche dans P gr. de gélatine ordinaire. L'acidité rapportée à 100 gr. de gélatine sèche est l'acidité corrigée Ac.

$$Ac = 0{,}49\ \frac{n}{p}\ \%\ \text{en } SO^4H^2$$

Les échantillons étudiés nous ont fourni des acidités comprises entre 0 gr. 20 et 1 gr. 07 % de gélatine ordinaire à

l'exception d'une gélatine en grains qui présentait une acidité de 1 gr. 82 % en SO^4H^2.

4° **Teneur en cendres**. — Toutes les pharmacopées exigent après incinération, un résidu inférieur à 2 %. Cattelain trouve ce chiffre trop élevé et propose de l'abaisser à 1 gr. 50 %, le chiffre de 2 % correspondant aux gélatines commerciales et non aux gélatines officinales.

Obtention des cendres. — L'incinération de la gélatine est une opération délicate, car par le chauffage la gélatine noircit, se liquéfie et boursoufle en une masse charbonneuse qui a tendance à déborder et il se produit en même temps un dégagement abondant de fumées épaisses.

Nous avons opéré ainsi :

La gélatine qui a servi à déterminer la teneur en eau est portée après dessiccation complète dans un four à moufle. Nous avons d'abord chauffé très lentement de façon à éviter le gonflement de la masse et réduire au minimum la production de fumées. Ce n'est que lorsque le chauffage un peu forcé ne donne plus de vapeurs épaisses que nous avons augmenté le feu afin d'obtenir des cendres blanches.

Nous avons alors laissé refroidir au dessiccateur, nous avons pesé et nous avons rapporté le poids trouvé au poids P de la prise d'essai qui a servi à déterminer la teneur en eau.

Nous avons trouvé des chiffres compris entre 1 gr. 14 et 1 gr. 49 % pour les échantillons de gélatine officinale étudiés et une teneur de 2 gr. 10 % pour une gélatine du commerce. Ceci justifie bien les remarques formulées par Cattelain, au sujet de la tolérance du Codex, pour la teneur en cendres.

5° **Examen des cendres**. — Dans les cendres ainsi obtenues nous avons recherché les métaux lourds les plus couramment rencontrés, c'est-à-dire Cu et Mg. Nous y avons également caractérisé SO^{4--}, PO^{4---} Ca^{+} Fe^{++} Mg^{++} qui en sont les éléments constitutifs constants.

Pour faire ces recherches nous avons commencé par trai-

ter les cendres obtenues par l'acide azotique et nous avons chassé l'excès d'acide par chauffage.

Nous avons dissous ce résidu dans 3 cc. d'acide chlorhydrique à 10 % et nous avons mis la solution dans un tube à centrifuger. Puis nous avons ajouté un excès d'ammoniaque. Nous avons alors observé la coloration produite. La coloration bleue de la solution ammoniacale révèle la présence de Cu.

L'addition d'ammoniaque produit un précipité abondant renfermant le $PO^{4}{}^{---}$ Fe^{++} Ca^{++} Mg^{++} et éventuellement Mn^{++}. Pour séparer ce précipité de la solution ammoniacale, nous avons préféré la centrifugation à la filtration afin d'éviter les pertes possibles.

Sur le précipité on caractérise :

Fe^{III} par le Ferrocyanure de K.

$PO^{4}{}^{---}$ par le réactif nitromolybdique, et nous avons recherché Mn par la réaction de Marshall Bertrand.

« On fait dissoudre 5 centigrammes de précipité dans 5 cc. d'acide nitrique au 1/4, on ajoute V gouttes de $NO^{3}Ag$ à 10 % et 0 gr. 25 de persulfate de soude. On fait bouillir, on ne doit observer aucune coloration. Une coloration rose décèle la présence de Mn.

Résultats. — Dans toutes les gélatines étudiées, nous avons trouvé :

$SO^{4}{}^{--}$ $PO^{4}{}^{---}$, Ca^{++}, Mg^{++}, Fe^{+++}

Dans une seule nous avons trouvé Cu par la réaction à l'ammoniaque.

6° **Recherche et dosage de SO^{2}.** — Le Codex ne signale rien au sujet de la présence de SO^{2} dans la gélatine. Le F. H. M. dit : « La gélatine doit être exempte de SO^{2}, ce que l'on voit en recevant le distillat phosphorique dans du chlorure de baryum iodé. »

La pharmacopée américaine (septembre 1916) donne une technique détaillée de recherche de SO^{2} et fixe les quantités limites.

« Dans un ballon à long col, faire dissoudre 20 gr. de gélatine dans 150 cc. d'eau chaude. Ajouter 5 cc. d'acide phosphorique officinal et 1 gr. de bicarbonate de soude. Relier à un réfrigérant. Distiller 50 cc. et recevoir le distillat dans 50 cc. d'iode N/10. Ajouter au distillat quelques gouttes d'HCl et 2 cc. de $BaCl^2$. Chauffer au B.-M. jusqu'à ce que le liquide soit à peu près décoloré, le précipité de $BaCl^2$ s'il y en a, après filtration, lavage et calcination, ne doit pas peser plus de 0 gr. 015, ce qui correspond à moins de 0 gr. 02 % de SO^2, correction faite des sulfates pouvant être présents dans 50 cc. de solution iodée.

La pharmacopée allemande indique également la recherche de SO^2 par distillation sur une solution d'iode, mais au lieu de peser elle fixe seulement une limite supérieure ; la totalité du SO^3 formé devant être précipité par une quantité fixée de $BaCl^2$.

Padé, au lieu de distiller directement, entraîne SO^2 par un courant de CO^2. Les gaz entraînés barbotent dans une solution d'iode qui retient SO^2. Ce procédé a été également préconisé par Haas pour le dosage de SO^2 dans les vins.

Pour le dosage de SO^2 dans la gélatine, nous avons employé la technique suivante qui diffère des précédentes par plusieurs points :

a) Entraînement de SO^2 par la vapeur d'eau au lieu de CO^2 ;

b) Le distillat au lieu d'être reçu dans de l'iode N/10 est reçu dans de la soude N comme le préconisent Blarez et Chelle pour doser SO^2 dans le vin ;

c) Le sulfite de soude formé est dosé par iodométrie.

Nous avons opéré dans un appareil identique à celui qui est employé pour le dosage de l'acidité volatile du vin. Il comprend un ballon A générateur de vapeur d'eau, un ballon B contenant la gélatine à étudier (10 gr. environ) dissoute dans 10 fois son poids d'eau et additionnée de 5 cc. environ de PO^4H^3 officinal. Ce ballon B est relié, d'une part, à A par un tube plongeant au fond de B et d'autre part à un réfrigérant descendant.

On chauffe d'abord A et B, les vapeurs qui se dégagent de A viennent barboter dans B, quand l'ébullition est atteinte on arrête le feu sous B et on le règle sous A car il faut avoir soin d'éviter en B une ébullition tumultueuse pour empêcher la formation d'une mousse abondante pouvant envahir l'appareil et passer dans le réfrigérant.

Quand le chauffage est bien réglé, les vapeurs issues de A arrivent régulièrement en B et y entretiennent l'ébullition, puis ces vapeurs se condensent dans le réfrigérant et arrivent dans le verre V contenant la soude (10 cc. de NaOH N). On continue l'opération jusqu'à obtention de 50 cc. de distillat.

On ajoute alors dans le verre V : 11 cc. de SO^4H^2 N et un peu de bicarbonate pour avoir dans le milieu une alcalinité légère nécessaire à un bon dosage iodométrique. On ajoute 25 cc. d'iode N/100.

Dans un verre témoin, on met :

10 cc. de soude N
50 cc. d'eau distillée
11 cc. de SO^4H^2
20 centigrammes de bicarbonate
25 cc. d'iode N/100

Dans chacun des verres on ajoute de l'hyposulfite de soude N/100 jusqu'à décoloration.

Soit N_e cc. pour l'essai.

N_t cc. pour le témoin.

$N_t - N_e$ représente le nombre de cc. d'I N/100 nécessaire pour oxyder le SO^2 distillé.

Cette méthode a pour avantage :

1° L'entraînement à la vapeur d'eau qui permet d'opérer à 100° en atmosphère de vapeur d'eau donc à l'abri de l'air et dispense d'un générateur à CO^2.

2° Le dosage iodométrique de SO^2.

La réception du courant gazeux (distillat en atmosphère de CO^2 ou de vapeur d'eau) interdit l'emploi du dosage iodométrique qui est cependant plus commode que le dosage pondéral du sulfate de baryum formé et l'approximation

du sulfate formé est délicate et imprécise en liquide coloré.

La réception du distillat sur la soude est facile et permet le dosage iodométrique de SO^2.

Nous avons trouvé par ce procédé des teneurs en SO^2 souvent supérieures à la tolérance de la pharmacopée américaine puisque nous avons trouvé des teneurs comprises entre 0 gr. 012 % et 0 gr. 112 %.

7° **Recherche sur la teneur en produits d'hydrolyse.** — Nous venons d'étudier les différents tests préconisés par les pharmacopées pour apprécier la qualité d'une gélatine. Dans l'industrie des colles et des gélatines, on a préconisé d'autres tests.

Certains procédés d'appréciation, procédés physiques ou mécaniques, tels que la mesure de la viscosité d'une solution ou la détermination de son point de fusion, ne présentent qu'un intérêt industriel car ils ne sont applicables qu'aux colles et aux gélatines grossières. Mais on a proposé aussi des procédés chimiques basés sur les deux déterminations suivantes.

Détermination de l'azote total.

Détermination de l'azote précipitable par un réactif donné. La comparaison de ces deux chiffres devait permettre d'apprécier la richesse en produits d'hydrolyse de la gélatine étudiée. Des essais faits avec le tanin, avec le sulfate de zinc à saturation, n'ont conduit à aucun résultat certain (Vézien).

Nous avons cherché à apprécier le degré d'hydrolyse d'une gélatine par action du formol. Nous savons que le formol agit sur les matières protéiques en bloquant les fonctions amines et en libérant les fonctions acides des acides aminés. (Dosage des acides aminés : procédé Sörensen). Cette propriété a été mise à profit pour le dosage des protéines du lait.

Si à une solution de gélatine neutralisée à la phtaléine on ajoute du formol, la solution devient acide, de l'acidité

ainsi obtenue, nous pouvons déduire l'azote aminé. Javillier et Guérithault ont utilisé cette propriété du formol pour doser l'azote aminé des peptones officinales et s'en servent pour apprécier le degré de dégradation par la détermination du rapport :

$$\frac{\text{N total}}{\text{N aminé}}$$

Nous avons appliqué la méthode à la gélatine en opérant ainsi : mettre 2 grammes de gélatine (ou 20 cc. de solution à 10 %) dans 50 cc. d'eau (ou 30 cc. d'eau). Faire dissoudre au B.-M. Laisser refroidir vers 35° ou 40°. Neutraliser en présence de phtaléine. Ajoutons 10 cc. de formol neutre. Neutraliser l'acidité produite par NaOH N/10. En déduire N aminé.

1 cc. NaOH N/10 = 0 gr. 0014 N

(Le réactif de Nessler ne décelant pas d' NH^3 nous avons admis que la totalité de l'azote était à l'état d'acide aminé.)

Déterminer l'azote total par la méthode de Kjeldalh.

Faire le rapport :

$$\frac{\text{N total}}{\text{N aminé}}$$

Nous avons déterminé ce rapport pour les diverses gélatines étudiées. Nous avons trouvé des chiffres identiques.

Pour ces différentes gélatines :

$$\frac{Nt}{Na} = 41$$

Nous avons ensuite étudié ce rapport pour des solutions de gélatine fortement hydrolysées par les traitements suivants :

1re Solution. — Solution de gélatine à 10 % contenant 4 gr. 90 de SO^2H^4 par litre maintenue à l'autoclave 1/2 heure à 125°.

2e Solution. — Solution de gélatine à 10 % contenant 4 gr. de NaOH par litre maintenue à l'autoclave 1/2 heure à 125°.

Pour la première nous avons trouvé :

$$\frac{\text{N total}}{\text{N aminé}} = 24$$

Pour la deuxième :

$$\frac{\text{N total}}{\text{N aminé}} = 19.$$

Nous voyons par là que la présence de produits d'hydrolyse diminue ce rapport.

Nous avons ensuite fait cette détermination avec 6 solutions de gélatine stérilisées suivant des méthodes différentes, afin d'avoir des solutions différemment hydrolysées.

Solution 1. — Stérilisée suivant la technique indiquée par le Codex pour la stérilisation du sérum gélatiné, soit :

2 fois à 115° pendant 15 minutes.

Solution 2. — Suivant la technique du F. H. M.

1 stérilisation à 115° pendant 30 minutes.
1 stérilisation à 110° pendant 15 minutes.

Solution 3. — Suivant le procédé de la pharmacopée suisse : 3 jours consécutifs à l'ébullition pendant 1/4 heure.

Solution 4. — Stérilisée une demi-heure à 120°.

Solution 5. — Stérilisée une demi-heure à 130°.

Solution 6. — N'a pas été stérilisée. — Sert de témoin.

Nous avons étudié pour chacun le rapport $\frac{\text{N total}}{\text{N aminé}}$ et nous avons étudié en même temps la prise en gelée de la solution à 1 %.

Nous avons trouvé :

1. $\frac{Nt}{Na} = 41$ la solution à 1 % se prend en gelée.

2.	$\frac{Nt}{Na}$ =	41	la solution à 1 %	se prend en gelée.
3.	»	40	»	se prend mal.
4.	»	39,4	»	ne se prend pas.
5.	»	38,6	»	ne se prend pas.
6.	»	41	»	se prend bien.

Cette expérience montre qu'au cours d'une stérilisation ce rapport varie dans des limites assez étroites, bien que la prise en gelée soit altérée de façon notable.

D'autre part, la détermination précise de l'azote aminé est très difficile. Il est indispensable pour obtenir des résultats comparables entre eux, d'opérer dans des conditions rigoureusement identiques.

La concentration de la gélatine dans la solution a une grosse importance de même que la concentration du formol.

Aussi il importe d'opérer avec les mêmes quantités de gélatine, de formol, prises sous les mêmes dilutions et à la même température, sinon les résultats pourront varier dans des limites assez larges, et cette méthode n'est pas applicable à la gélatine prise en solution diluée. D'autre part, la prise en masse de la solution gélatineuse par l'action du formol oblige à opérer rapidement. La prise en gelée est un caractère plus certain, et c'est le pouvoir gélogène qui décèle le mieux les altérations subies par la gélatine.

8° **Résumé des essais.** — Résumons dans un tableau les résultats trouvés dans ces divers essais.

Nous avons étudié ainsi :

5 Gélatines officinales en plaques d'origine différente O_1, O_2, O_3, O_4, O_5.

Une gélatine commerciale extra C.

Deux gélatines en grains G_1 et G_2.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Les résultats de nos recherches sur le rapport $\frac{Nt}{Na}$ n'étant pas susceptibles d'applications pratiques, ne sont pas reproduits.

GÉLATINE	pH	ACIDITÉ EN SO^4H^2	ESSAIS	CENDRES	SO^2
O_1	5,2	0,96	17,29	1,34	0,044
O_2	5,8	1,07	15,96	1,17	0,012
O_3	6,2	0,48	17,71	1,14	0,080
O_4	6,4	0,52	18,52	1,14	0,112
O_5	6,5	0,25	21,09	1,49	0,031
C_1	6,8	0,31	17,96	2,10	0,059
G_1	5	1,82	15,81	0,71	0,020
G_2	6	0,60	18,60	2,03	0,064

Nous devons signaler en outre la présence de Cu en G_1 ;

9° **Conclusions**. — A la suite de ces différentes déterminations nous avons pensé qu'il y aurait intérêt à faire l'essai de la gélatine de la façon suivante :

ACIDITÉ. — *Acidité ionique*. — 10 cc. de solution à 1 % sont additionnés de 10 gouttes de colorant Guillaumin. Observer la coloration obtenue. En déduire le pH en se rapportant aux tableaux de comparaison.

Acidité de titration. — Dans un Erlenmeyer taré mettre un poids P de gélatine voisin de 5 gr. Ajouter 100 cc. d'eau distillée. Faire dissoudre au bain-marie, et laisser refroidir vers 35-40°, neutraliser à la soude N/10 en présence de phtaléine. Soit n cc. employés.

$$\text{Acidité en } SO^4H^2 = 0{,}49\ \frac{n}{P}.$$

L'acidité ne devra pas être supérieure à 2 % (soit 1,49 en HCl).

HUMIDITÉ ET CENDRES. — Dans une capsule en porcelaine de 10 cc. de diamètre environ, peser un poids de gélatine finement coupée, voisin de 10 gr. Porter à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant. La diminution de poids donne la

quantité d'eau contenue dans P gr. de gélatine. Rapporter le résultat à 100 gr.

Porter ensuite au four à moufle en chauffant très modérément d'abord pour éviter la liquéfaction et le boursoufflement de la masse. Puis quand le dégagement de vapeurs épaisses est terminé, ce dont on s'assure en chauffant un peu plus fort, calciner jusqu'à obtention de cendres blanches.

Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser. On a ainsi les cendres de P grammes de gélatine. Rapporter à 100 gr. On doit trouver un chiffre inférieur à 1 gr. 50.

Traiter les cendres ainsi obtenues par NO^3H. Evaporer. Reprendre par HCl pour redissoudre. Ajouter un excès d'ammoniaque. Il se forme un précipité. Séparer le précipité, le liquide ne doit pas être coloré en bleu (Cu).

Recherche et dosage de SO^2. — Mettre dans un ballon de 1 litre à long col, 10 gr. de gélatine (ou un poids *p* voisin de 10 gr.) et 200 cc. d'eau distillée. Ajouter 5 cc. d'acide phosphorique à 85 %.

Faire barboter dans cette solution un courant de vapeur d'eau. Relier à un réfrigérant. Recevoir le distillat dans 10 cc. de NaOH N. Distiller 50 cc. environ.

Ajouter 11 cc. de SO^4H^2 N et un peu de bicarbonate de soude et 25 cc. d'iode N/100. Décolorer par l'hyposulfite de soude N/100. Soit N^e cc. employés.

Mettre dans un verre :

10 cc. de soude N
50 cc. d'eau distillée
11 cc. de SO^4H^3N et 20 ctg. de CO^3NaH
25 cc. de IN/100.

Décolorer par l'hyposulfite N/100.
Soit Nt cc. employés.

$$SO^2\,\% = \frac{3.2\ (N_t - N_e)}{1.000}\ \text{gr.}$$

V. — Teneur en azote de la gélatine officinale.

Avant d'aborder le dosage de la gélatine dans les divers milieux, nous avons pensé qu'il était nécessaire de déterminer le coefficient à utiliser pour passer de l'azote à la gélatine, car les chiffres trouvés dans les divers mémoires sont assez différents. Cela tient pour une grande part à des différences de teneur en eau et en cendres des gélatines examinées.

Nous avons vu dans la première partie (ch. II) la composition de la gélatine pure.

Les analyses les plus récentes, celles de Dhéré et Gorgowleski donnent pour la gélatine pure complètement débarrassée des sels et de produits d'hydrolyse, une teneur en azote de 18,05 % pour la gélatine Coignet et de 18,10 % pour la gélatine Grübler.

Cattelain admet pour le dosage azotométrique de la gélatine ordinaire contenant 10 % d'eau, une teneur de 16 à 16,5 %, sans tenir compte des sels qu'elle peut contenir. Salmon adopte pour ce même dosage, le coefficient 6,5 pour la gélatine ordinaire, sans préciser la teneur en eau et en cendres ; ce coefficient 6,5 correspond à une teneur en azote de 15,38 %.

Nous avons dosé l'azote dans les différents échantillons de gélatine examinés en opérant de la façon suivante :

Peser un poids P de gélatine ordinaire voisin de 0 gr. 80, dans une petite capsule en porcelaine, faire dissoudre dans un peu d'eau distillée chaude. Faire passer dans un ballon de 100 cc. Laver soigneusement la petite capsule à l'eau chaude en réunissant les eaux de lavage à la solution dans le ballon jaugé. Laisser refroidir, compléter à 100 cc. et agiter.

Mettre 10 cc. de cette solution dans un microkjeldalh avec 2 cc. de mélange destructeur. Chauffer jusqu'à décoloration complète. Doser NH^3 formé par distillation dans un appareil de Parnas et Wagner.

Le distillat est reçu dans 10 cc. de $SO^4H^2N/10$.

Doser l'excès d'acidité par NaOH N/10, en présence de rouge de méthyle. Soit n le nombre de cc. de soude employés.

$$\text{Azote } \% = 1{,}4\ \frac{10-n}{P}.$$

Nous avons trouvé pour les gélatines officinales, des teneurs en azote qui étaient fonction de la teneur en impuretés des gélatines étudiées.

Nous avons trouvé 13 gr. 87 % d'azote dans une gélatine contenant 21 gr. 09 % d'eau et 1 gr. 49 % de cendres et 14 gr. 70 % d'azote dans une gélatine contenant 15 gr. 96 % d'eau et 1 gr. 17 % de cendres. En rapportant ces résultats à de la gélatine séchée et déminéralisée nous avons trouvé des chiffres compris entre 17 gr. 73 % et 17 gr. 78 %, chiffres inférieurs à ceux trouvés par Dhéré et Gorgowleski avec de la gélatine séchée, déminéralisée, et de plus complètement débarrassée de produits d'hydrolyse.

Nous avons adopté pour les calculs, le chiffre moyen de 17 gr. 75 %.

Les gélatines officinales contiennent en moyenne 81 % de gélatine séchée et déminéralisée. On peut donc adopter pour la gélatine officinale une teneur moyenne en azote de:

$$17{,}75 \times 0{,}81 = 14 \text{ gr. } 37\ \%.$$

Dans la pratique on utilise la gélatine telle qu'elle est livrée par le commerce, c'est-à-dire chargée d'humidité et de matières minérales.

En conséquence, suivant le cas on devra exprimer le résultat en gélatine vraie ou en gélatine commerciale et le facteur à employer pour transformer l'azote trouvé en gélatine sera différent.

Il sera de : $\frac{100}{17{,}75}$ soit 5,63 pour la gélatine vraie.

de : $\frac{100}{14{,}37}$ soit 6,95 pour la gélatine officinale.

CHAPITRE II

Glycérine gélatinée.

I. Généralités. — II. Examen des ovules et suppositoires. 1° Formules proposées. 2° Dosage de la gélatine. 3° Dosage de la glycérine. 4° Dosage de l'eau. 5° Recherche de la gélose. 6° Cas des ovules au tanin. 7° Résultats obtenus. — III. Glycérine gélatinée pour capsules. 1° Généralités. Formules. 2° Acidité. 3° Saccharose. 4° Charges minérales. — IV. Glycérine gélatinée pour enrobage.

I. — Généralités.

La glycérine solidifiée par la gélatine est utilisée dans la préparation de diverses formes galéniques dont elle constitue la base : suppositoires, ovules, bougies, capsules, enrobage, etc...

Les proportions relatives de la glycérine et de la gélatine sont variables suivant le but que l'on se propose ; souvent on ajoute à la pâte diverses substances, telles la saccharose, la gomme arabique. Pour une même préparation, les formules adoptées par les diverses pharmacopées ne sont pas identiques et de même les formules adoptées par les spécialistes, pour la fabrication de ces produits, sont souvent très différentes.

II. — Examen des ovules et suppositoires.

1° **Formules proposées.** — Le Codex a adopté pour la préparation de la glycérine solidifiée pour ovules, la formule suivante :

Gélatine lavée et séchée.....	10 gr.
Eau distillée.....	30 gr.
Glycérine.....	60 gr.

ce qui représente une teneur théorique de 10 % pour la gélatine et de 60 % pour la glycérine.

Le F. H. M. emploie pour la préparation des suppositoires à la glycérine, la formule suivante :

Gélatine	5 gr.
Eau distillée	10 gr.
Glycérine	25 gr.

soit une teneur théorique de 12 gr. 5 % en gélatine et de 62 gr. 5 % en glycérine.

La pharmacopée britannique prescrit pour les suppositoires à la glycérine, la formule suivante :

Gélatine	14 gr.
Glycérine	70 gr.
Eau, q. s. p	100 gr.

On a depuis longtemps reproché à ces préparations de ne pas être suffisamment fusibles et il a été publié un grand nombre de formules pour arriver à corriger ce défaut.

Le point de ramollissement de ces préparations est voisin de 41° C., mais l'humidité des organes favorise le ramollissement et la fusion.

Bouvier pense que la quantité de gélatine est susceptible d'être abaissée et il préconise de nouvelles formules comme :

Gélatine	16 gr.
Eau	45 gr.
Glycérine	200 gr.

ce qui correspond à une teneur de 6 gr. 34 % en gélatine ; le point de ramollissement est encore peu changé. Il propose d'adjoindre de la gélose à la gélatine pour abaisser ce point de ramollissement.

La fusibilité des ovules à la glycérine dépend essentiellement de la constitution de la pâte employée ; mais la glycérine gélatinée est un excipient et les médicaments incorporés dans cette masse peuvent avoir une action sur la fusibilité.

Ainsi les ovules à l'Ichtyol que nous avons essayés se sont montrés facilement fusibles. Par contre les ovules à base

de substances phénoliques paraissent fondre moins facilement. Nous avons vu dans la première partie (page 32), que certains phénols et surtout les produits d'oxydation des phénols, étaient susceptibles d'insolubiliser la gélatine et de donner des gelées infusibles. Cette insolubilisation de la gélatine par les produits d'oxydation est très lente et ceci peut justifier la préférence de certains praticiens pour les ovules fraîchement préparés.

Le commerce livre aujourd'hui un grand nombre de ces produits sous forme de spécialités et il peut être intéressant de contrôler ou d'examiner ces produits.

On pourra déterminer l'acidité et les cendres comme pour l'examen de la gélatine. Les chiffres obtenus seront comparés à ceux qui devraient être obtenus avec la même quantité de gélatine, compte tenu s'il y a lieu de la substance médicamenteuse incorporée.

En outre, on pourra rechercher la proportion relative des constituants, par le dosage de la gélatine, de la glycérine et de l'eau, et il conviendra également de rechercher la gélose.

2° **Dosage de la gélatine.** — La gélatine peut être dosée directement par azotométrie, mais en présence de glycérine, la destruction par l'acide sulfurique se fait avec production d'une mousse abondante emplissant le ballon et son col et risquant de causer des pertes.

Aussi nous avons préféré séparer la gélatine. Pour cela il suffit de faire dissoudre un peu de pâte gélatinée à étudier dans un peu d'eau et de précipiter la gélatine de cette solution. Pour cela nous pouvons employer l'alcool ou les acides tungstique ou phosphotungstique. Avec l'alcool, la technique que nous préconisons est la suivante :

Peser 10 gr. de pâte à étudier (ou un poids *p* voisin de 10 gr.), dans une petite capsule. Ajouter un peu d'eau, faire dissoudre au bain-marie et faire passer la solution dans un ballon de 100 cc. Laver la capsule à l'eau distillée chaude et réunir les eaux de lavage dans le ballon jaugé. Ajouter 10 cc. de la solution tampon acide acétique – acétate de soude à

pH 4,7. Laisser refroidir et compléter à 100 cc. Agiter. C'est la solution M. Verser 20 cc. de cette solution dans 100 cc. d'alcool à 96°, placés dans un Bécher. Laisser reposer quelques minutes. Agiter soigneusement. Filtrer sur un filtre sans plis en retenant autant que possible le précipité dans le verre où s'est faite la précipitation.

Le précipité resté dans le Bécher est dissous dans un peu d'eau chaude. Faire passer cette solution dans un ballon jaugé de 100 cc. Puis laver le Bécher et le filtre à l'eau distillée chaude, et réunir les eaux de lavage dans le ballon jaugé. Si le filtre a retenu beaucoup de précipité, l'eau chaude qui le lave se charge en gélatine et ne passe pas à travers le filtre. C'est pourquoi il faut opérer de façon à entraîner le moins possible de précipité dans le filtre.

Laisser refroidir la solution de gélatine et les eaux de lavage contenues dans le ballon jaugé. Compléter à 100 cc. et agiter.

Doser l'azote contenu dans 10 cc. de cette solution ; 10 cc. de cette solution correspondent à $\frac{p}{50}$ de pâte.

Soit n le nombre de cc. acide N/50 neutralisés par l'ammoniaque formé.

Le chiffre d'azote pour cent de pâte est :

$$N = 1{,}4\,\frac{n}{p}$$

La teneur de la pâte en gélatine est :

$$\% = 6{,}95 \times 1{,}4\,\frac{n}{p}.$$

On peut aussi doser la gélatine contenue dans la solution M en précipitant par l'acide tungstique. Le précipité obtenu est souvent gluant et visqueux, adhérant au verre et difficile à rassembler et à séparer du liquide.

L'acide phosphotungstique donne un précipité grumeleux, moins pâteux et plus facile à séparer. Cette différence déjà signalée (page 94) est plus accentuée en milieu glycériné.

Le précipité formé retenu par le filtredoit être redissout par de la soude ; la dissolution du précipité contenu dans le filtre est difficile, il y a avantage à séparer le précipité par centrifugation et à le redissoudre par la soude dans le tube à centrifuger.

On emploiera avantageusement la technique suivante :

Mettre dans un tube à centrifuger, 5 cc. de solution M soit $\frac{p}{20}$ (ou d'une solution de pâte à 10 %). Ajouter 2 cc. de phosphotungstate de soude et 2 cc de $SO^4 H^2 \frac{2N}{3}$.

Centrifuger. Décanter. Dissoudre le culot de centrifugation dans 5 cc. de lessive de soude à 10 %. Faire passer directement dans un microkjeldalh, laver le tube à centrifuger avec 5 cc. d'eau distillée. Faire passer dans le Kjeldalh. Ajouter 3 cc. de mélange destructeur. Chauffer jusqu'à minéralisation. Doser NH^3 formé. Si n est le nombre de cc. de solution acide N/50 neutralisés par NH^3 formé, la teneur en azote de 100 gr. de pâte est :

$$N\ \% = \frac{14 \times n \times 20}{50.000 \times p} = 0{,}56\ \frac{n}{p}$$

La teneur en gélatine est :

$$\text{Gélatine}\ \% = 0{,}56\ \frac{n}{p} \times 6{,}95.$$

3° **Dosage de la glycérine.** — Nous avons utilisé pour ce dosage la technique indiquée par Cattelain, d'exécution facile dans un mélange riche en glycérine.

Peser 10 gr. de substance et mélanger avec 60 grammes de sulfate de soude anhydre bien desséché. Laisser en contact pendant 48 heures dans une armoire à dessiccation. Pulvériser la masse devenue friable et la placer dans un flacon taré à fond rond de 250 cc. Ajouter 100 cc. d'acétone bien desséché et maintenir à l'ébullition pendant une heure au réfrigérant ascendant. Rétablir après refroidissement le poids primitif par addition d'une quantité suffisante d'acétone et filtrer rapidement. Recueillir 50 cc. de filtrat dans une fiole d'Erlenmeyer préalablement tarée. Evaporer au bain-marie et terminer la dessiccation à l'étuve

chauffée à 50°. Contrôler le résultat en reprenant le résidu par 20 gr. d'éther acétique anhydre. Effectuer comme précédemment l'évaporation et la dessiccation.

4° **Dosage de l'eau.** — La technique la plus simple est également celle qu'a indiquée Cattelain pour l'analyse des glycérines solidifiées en général.

Peser exactement dans un vase à extrait de 35 mm. de diamètre, 10 gr. de glycérine solidifiée. Faire liquéfier à une douce chaleur et maintenir à l'étuve à 80° pendant 3 heures. Agiter à différentes reprises de manière à renouveler la surface d'évaporation. Laisser refroidir dans le vide sulfurique, et peser rapidement. En opérant dans ces conditions, la perte en glycérine est négligeable. Déduire du chiffre obtenu la quantité d'eau apportée par la gélatine.

5° **Recherche de la gélose.** — L'addition de la gélose aux glycérines gélatinées a pour but de diminuer la quantité de gélatine pour obtenir des ovules plus fusibles sans diminuer la consistance. Bouvier en préconise l'emploi, et propose la formule suivante pour obtenir des ovules fermes et bien fusibles.

Eau distillée	50
Gélose sèche	0,05
Gélatine	16
Glycérine	200

Cattelain préconise pour cette recherche l'emploi de la méthode de Trillat et Desmoulière.

Nous avons préféré la méthode suivante qui est plus rapide et aussi sensible.

20 cc. de la solution à 10 % de gélatine glycérinée sont précipités par 100 cc. d'alcool à 96°. Filtrer et dissoudre le précipité dans 10 cc. d'eau distillée.

Ajouter 30 cc. d'alcool sodé ainsi préparé :

Soude 5N	200 cc.
Alcool absolu	800
Eau distillée q. s. p.	1.000

Dans ces conditions la gélatine ne donne aucun précipité.

Laisser reposer 5 minutes. S'il se forme un précipité, centrifuger 10 minutes à 2.500 tours environ pour le séparer. Recueillir le précipité et faire bouillir avec quelques centimètres cubes d'eau distillée.

Remplacer de temps en temps l'eau qui s'évapore. Maintenir l'ébullition une demi-heure. La prise en gelée par refroidissement indique la présence de gélose.

6° **Cas des ovules au tanin.** — Les ovules au tanin se présentent en général en une masse brune transparente.

Le mode de préparation du Codex conduit à des ovules opaques.

Pour les obtenir transparents on a proposé divers artifices comme l'addition de borate de soude ou d'acide tartrique ou par chauffage plus poussé que ne l'indique le Codex. Ce dernier procédé nous a donné entière satisfaction et pour ne pas pousser inutilement le chauffage, voici comment nous opérons.

Nous faisons dissoudre à froid le tanin dans l'eau distillée et nous faisons absorber cette solution par la gélatine et nous portons cette solution dans la glycérine modérément chauffée comme l'indique le Codex Nous obtenons alors une sorte de glu filante comme l'indique P. Adoue. Nous continuons à chauffer jusqu'à dissolution. A ce moment, nous augmentons un peu le chauffage en évitant toutefois l'ébullition de la masse. De temps en temps à l'aide d'un agitateur, nous mettons une goutte du mélange sur le bord du moule à ovules. Cette goutte par refroidissement se prend en une masse opaque au début, puis quand le chauffage est suffisant, la goutte par refroidissement se prend en une petite masse transparente.

Ce point est facile à saisir. En coulant à ce moment, nous sommes sûrs d'obtenir des ovules transparents et la surchauffe est réduite au minimum.

Ce procédé ne change pas les conditions de fusion.

Dans les ovules au tanin du commerce, il convient de rechercher si la transparence n'a pas été obtenue par addi-

tion de substances chimiques, acide tartrique et borates en particulier. L'eau et la glycérine pourront être dosées comme dans les autres ovules.

Le dosage de la gélatine présente une difficulté. On ne peut pas préparer une solution de gélatine tannique. Aussi il est préférable dans ce cas de doser directement l'azote sans éliminer la glycérine.

7° **Résultats obtenus.** — En examinant suivant cette méthode 7 échantillons d'ovules commerciaux, nous avons trouvé les compositions suivantes.

	Gélatine %	Glycérine %	Eau %
A	7,42	68,2	23,7
B	10,5	70,2	18,1
C	8,33	68,8	22,1
D	8,54	74,2	16,1
E	7,21	72,6	18,4
F	8,75	71	19,1
G	11.39	65	22

En examinant de même la pâte à ovules préparée comme l'indique le Codex, nous avons trouvé :

Gélatine : 9,66 Glycérine : 63 Eau : 27

la formule de la pharmacopée anglaise donne :

Gélatine : 14 Glycérine : 70 Eau : 16

sur les 7 échantillons d'ovules examinés, cinq sont moins chargés en gélatine que la pâte à ovules du Codex, et tous sont beaucoup moins riches en eau et plus riches en glycérine.

Aucun des ovules examinés ne contenait de gélose.

III. — Glycérine gélatinée pour capsules.

1° **Généralités. Formules.** — Les glycérines gélatinées pour capsules sont beaucoup plus riches en gélatine que les

glycérines gélatinées pour ovules et suppositoires et leur composition est souvent plus complexe.

Le Codex, tout en laissant libre choix au fabriquant, donne deux formules types.

Au Codex 1908, à l'article « Capsules médicamenteuses », on trouve la formule suivante :

Gélatine officinale.....	25 gr.
Glycérine	10 gr.
Sucre blanc.....	8 gr.
Eau.....	45 gr.

Le supplément de 1926 donne une autre formule :

Gélatine.....	100 gr.
Glycérine.....	50 gr.
Eau.....	125 gr.

La pharmacopée américaine indique comme formule de la glycérine solidifiée :

Gélatine.....		100 gr.
Glycérine		100 gr.
Eau.....	q s. p.	200 gr.

Faire gonfler la gélatine dans un peu d'eau et ramener ensuite le tout à 200 gr. Cette formule sert en même temps de base à la préparation des ovules par dilution de la masse avec de l'eau et de la glycérine.

Le capsulage des médicaments est aujourd'hui d'ordre uniquement industriel. La préparation magistrale des capsules, préconisée par Lépinois et Michel, n'est pas passée dans la pratique.

Le pharmacien ne préparant pas ces produits doit les contrôler. L'essai prescrit par le Codex est uniquement basé sur le poids relatif de l'enrobage et de la substance active, mais il peut y avoir intérêt dans certains cas à examiner la constitution de l'enrobage.

Pour cela, ouvrir les capsules, les débarrasser de leur contenu, laver les parois à l'éther. Pour étudier la constitution, doser la gélatine, l'eau et la glycérine comme pour les ovules.

On pourra y rechercher la gélose, il y aura le plus souvent intérêt à déterminer l'acidité et les charges minérales et rechercher la saccharose.

2° **Acidité.** — Pour déterminer l'acidité on opérera comme avec la gélatine simple (voir page 104) et on comparera le chiffre obtenu avec l'acidité pouvant provenir de la gélatine. L'acidité normale de la gélatine étant de 1 gr. 50 %.

3° **Saccharose.** — L'addition de saccharose à la glycérine gélatinée pour capsules est prévue par le Codex.

Pour la rechercher comme pour la doser, il y a intérêt à éliminer la gélatine.

On l'éliminera par action de l'acide phosphotungstique.

Faire dissoudre un poids *p* de parois voisin de 10 gr. dans 100 cc. d'eau. A 20 cc. de cette solution, ajouter :

10 cc. de Phosphotungstate de soude à 10 %
10 cc. de SO^4H^2N.

Filtrer. Maintenir la liqueur ainsi obtenue 1/2 heure au bain-marie pour obtenir l'interversion. Sur cette liqueur, doser le sucre par les méthodes habituelles. On peut aussi faire éliminer la gélatine par action de l'alcool.

Nous avons opéré ainsi :

Faire liquéfier au bain-marie 10 gr. de glycérine solidifiée à étudier dans 5 cc. d'eau distillée et 5 cc. de solution tampon à pH 4,7. Faire passer dans un ballon de 200 cc. contenant 150 cc. d'alcool à 96°. Laver la capsule où s'est faite la fusion avec 10 cc. d'eau distillée. Verser dans le ballon, agiter, compléter à 200 cc. avec de l'alcool. Filtrer. Recueillir 100 cc. de filtrat. Distiller l'alcool. Reprendre par un peu d'eau distillée (pour avoir 80 cc. de liquide environ), ajouter 10 cc. de SO^4H^2 N/10. Maintenir au bain-marie une demi-heure pour intervertir. Compléter à 100 cc. Doser.

4° **Charges minérales.** — La détermination des cendres servira à déceler les charges minérales diverses. Un chiffre élevé en cendres indiquera soit l'emploi d'une gélatine de mau-

vaise qualité, soit l'addition volontaire de charges minérales.

Pour obtenir les cendres, opérer comme avec la gélatine ordinaire (voir page 105).

Sur les cendres ainsi obtenues, on peut exécuter diverses recherches. Cattelain conseille la détermination des chlorures. On pourra également rechercher en dehors des éléments habituels, sulfates, phosphates, calcium, fer et magnésium, le cuivre et les borates.

IV. — Gélatine pour enrobage.

L'emploi de la gélatine pour l'enrobage des pilules a été préconisé dès 1838 par Garot qui employait pour cet usage une simple solution de gélatine.

Vée, en 1840, a préconisé pour cet usage une autre formule :

Gélatine sèche.....	1 partie
Pâte de jujube.....	7 parties

Faire dissoudre le tout dans un peu d'eau.

Bouvet, en 1920, étudie différentes formules ; il reproduit celle du *British Pharmaceutical Codex*.

Gélatine.....	10 gr.
Mucilage de gomme arabique à 40 %...	10 gr.
Sol. saturée d'acide borique... q. s. p.	100 gr.

Le *Pharmaceutical formulas* donne une formule légèrement différente :

Gélatine.....	70 gr.
Mucilage de gomme arabique.....	42 gr.
Acide borique.....	12 gr.
Eau distillée.....	210 gr.

Pour l'étude de ces enrobages, il suffit de détacher avec un canif l'enrobage de la pilule. On recherchera le sucre après élimination de la gélatine et de la gomme arabique par l'alcool. On recherchera les substances minérales, acide borique dans les cendres. La séparation de la gélatine et de la gomme arabique est étudiée au chapitre IV : « La gélatine dans les boules de gomme. »

CHAPITRE III

Sérum gélatiné.

1° Préparation et stérilisation. — 2° Examen chimique.

1° **Préparation et stérilisation.** -- Le sérum gélatiné du Codex se prépare avec :

Gélatine.....	10 gr.
Chlorure de sodium.....	8 gr.
Eau distillée.....	1.000 gr.

C'est une solution de gélatine à 1 % dans du sérum physiologique.

Il y a deux conditions à réunir dans la préparation de ce sérum :

a) Stérilisation parfaite ;

b) Prise en gelée.

C'est le procédé remplissant au mieux ces deux conditions qui a été recherché.

Un chauffage trop intense ou trop prolongé fait perdre au sérum le pouvoir de se prendre en gelée. Un chauffage insuffisant donne une stérilisation incomplète.

Les divers procédés de préparation et de stérilisation ont été étudiés par Abry qui s'est arrêté aux procédés de stérilisation les plus rigoureux, négligeant au besoin l'altération de la gélatine par la chaleur.

M. Pégurier se ralliant à l'opinion de Pouchet dit que « l'état demi-solide du sérum gélatiné n'est pas indispensable pour assurer l'efficacité du produit ».

Il critique la complication de la préparation du Codex qui exige :

1 Dissolution au bain-marie ;
1 Stérilisation à l'autoclave ;

1 Mise en flacons stériles ;
1 Seconde stérilisation.

Il préconise l'emploi de solutions-mères à 10 % conservées en ampoules stériles.

La préparation du Codex peut être modifiée sans inconvénient en opérant ainsi :

a) Mettre dans un ballon de 1.500 cc. environ, 10 gr. de gélatine, 8 gr. de chlorure de sodium et 1.000 cc. d'eau.

b) Placer ce ballon dans l'autoclave en même temps que les flacons destinés à recevoir ce sérum. — Stériliser.

La chaleur de l'autoclave amène la dissolution et supprime le bain-marie.

c) Répartir le sérum dans les flacons stérilisés.

d) Stériliser à nouveau.

La conservation d'une solution-mère de gélatine à 10 % présente l'avantage pour le pharmacien de pouvoir obtenir rapidement des solutions de gélatine bien stériles à des titres variables pour injections, tamponnements, etc...

2° **Examen chimique du sérum gélatiné**. — Dans l'examen chimique d'un sérum gélatiné, il importe de doser les constituants, c'est-à-dire la gélatine et le chlorure de sodium, il importe également de vérifier le pouvoir gélogène, l'acidité et la présence de sels de Ca.

La gélatine pourra être dosée directement par azotométrie. Le chlorure de sodium sera dosé par la méthode Charpentier-Volhard.

Le Codex prescrivant de neutraliser la gélatine pour la préparation du sérum gélatiné, il importe de vérifier cette condition. On s'attachera surtout à l'acidité ionique.

La détermination de l'extrait sec pourra aider à dépister des surcharges.

Les sels de calcium pourraient être ajoutés en petites quantités pour renforcer l'action coagulante de la gélatine. On opérera cette recherche par précipitation du Ca^{++} par l'oxalate d'ammoniaque en milieu acétique.

CHAPITRE IV

La gélatine dans les boules de gomme.

1° Généralités. 2° Procédés de recherche. A) Procédé Carles B). Autres méthodes. 3° Méthodes de dosage. A) Procédé Trillat. B) Procédé de Salmon. 4° Séparation gélatine gomme. Dosage de la gélatine.

1° **Généralités.** — La gélatine est souvent employée dans la confection des pâtes et pastilles de gomme. Son pouvoir gélifiant est plus grand que celui de la gomme, aussi son emploi permet de diminuer la masse d'excipient et d'accroître la proportion de sucre.

The extra Pharmacopœia publie une formule de pâte à la gélatine destinée à servir d'excipient dans la préparation de diverses pâtes pectorales.

Cette substitution de la gélatine à la gomme est considérée en France comme une falsification et aux termes de l'article 9 du décret du 19 décembre 1910, les boules de gomme contenant de la gélatine ne peuvent être vendues sans une dénomination contenant le mot « gomme ». C'est cependant une falsification courante des diverses pâtes à base de gomme.

2° **Procédés de recherche.** — A) Procédé Carles. — Le procédé le plus pratique et le plus couramment employé est le procédé Carles. « Prendre une longue épingle recourbée en S. Accrocher à une extrémité une des pastilles suspectes et la soutenir par l'autre extrémité au rebord d'un verre dans la partie interne. »

Ajouter de l'eau froide de façon à immerger la pastille à examiner. Dans l'espace de quelques instants les

pastilles de gomme pure seront disparues, la dissolution sera intégrale. Si, au contraire, il y a de la gélatine, l'eau froide fera une sélection, dissoudra sucre et gomme et laissera intacte la gélatine même pendant plusieurs jours ; si bien que l'essai pourra même être quantitatif.

Le tanin montre en effet que dans la solution il ne se produit aucun précipité.

Une condition importante à réaliser pour cet essai, est d'opérer en lieu frais, car à température un peu élevée, la gélatine se laisse entraîner par l'eau.

B) Autres Méthodes. — La méthode officielle de recherche prescrit d'opérer de la façon suivante :

Dissoudre le produit dans lequel on soupçonne la présence de gélatine, dans un peu d'eau. Précipiter par l'alcool, recueillir le précipité et en faire deux parts, et pour mettre en évidence la gélatine dans ce précipité, la méthode préconise :

1° Le chauffage en présence de chaux sodée.

2° La précipitation par le tanin et l'acide picrique.

Durier craint que le premier essai soit positif en l'absence de gélatine ; certaines gommes pouvant fournir dans ces conditions un dégagement d'ammoniaque. Aussi il préfère effectuer sur le précipité redissout, les 3 réactions suivantes :.

a) Précipitation par l'acide picrique.

b) Précipitation par le tanin.

c) Réaction du biuret.

A cela il ajoute le dosage de l'azote total se basant sur une teneur en azote de 15 % pour la gélatine et de 0 gr. 50 % pour les gommes.

3° **Méthodes de dosage.** — A) Procédé Trillat. — Le procédé de dosage le plus anciennement connu est celui préconisé par Trillat qui consiste à insolubiliser la gélatine par le formol et à laver ce résidu insoluble pour le débarrasser des autres substances. Mais ce lavage est long et très délicat.

B) Procédé Salmon. — Salmon opère différemment, il

détermine d'abord par précipitation et pesée le poids a représentant la somme des poids x de gomme et y de gélatine contenu dans 100 gr. de produit.

$$x + y = a$$

Il détermine la quantité b d'azote contenu dans 100 grammes de produit et il écrit :

$$\frac{0,5}{100} x + \frac{y}{6,5} = b$$

se basant sur une teneur moyenne en azote de 0,5 % pour la gomme et de $\frac{100}{6,5}$ pour la gélatine.

Ce procédé est inapplicable aux pâtes contenant du blanc d'œuf ou d'autres substances azotées et nous avons pensé qu'il y aurait intérêt pour le dosage à séparer la gélatine de la gomme. On ne dose ainsi que l'azote de la gélatine et d'autre part la minéralisation au Kjeldalh d'un mélange aussi riche en matières hydrocarbonées que les pastilles de gomme est très difficile à conduire, la minéralisation de la gélatine après séparation ne présente pas cet inconvénient.

4° **Séparation gélatine-gomme. — Dosage de la gélatine.** — Cette séparation est basée sur les principes suivants :

La gomme et la gélatine en solution aqueuse à pH 4,7 sont entièrement précipitées si on additionne la solution de 5 fois son volume d'alcool à 96°.

Si on additionne une solution aqueuse de gomme et de gélatine, de 3 fois son volume d'alcool à 80°, contenant 40 gr. de soude par litre, la gélatine reste en solution, la gomme est précipitée.

Voici la technique que nous préconisons :

Réactifs. —

Solution acide acétique-acétate de soude M/5 à pH 4,7.
Alcool à 80° contenant 40 gr. de soude par litre.
Liquide destructeur pour Kjeldalh. (Voir page 46.)
Solution de NaOH N/50 et de SO^4H^2 N/50.
Rouge de méthyle.

Technique. — Dans une capsule de porcelaine tarée, peser 10 grammes (ou un poids *p* voisin de 10 grammes) de pastilles de gomme à étudier. Faire dissoudre dans 25 cc. d'eau, au bain-marie. Faire passer dans 1 ballon de 50 cc. Laver la capsule avec 10 cc. d'eau tiède, réunir à la solution dans le ballon jaugé. Ajouter 5 cc. de solution acétique tampon à pH 4,7. Compléter à 50 cc.

Verser 25 cc. de cette solution dans 125 cc. d'alcool à 96°. Il se produit un précipité abondant. Agiter soigneusement. Le précipité, qu'il soit de gomme ou de gélatine, se sépare bien, il est grumeleux ou floconneux et laisse un liquide surnageant clair. Laisser déposer et décanter le liquide sur un filtre sans plis. Faire passer sur ce filtre la totalité du liquide en ayant soin d'entraîner le moins possible de précipité.

Verser alors 20 cc. environ d'eau chaude sur le précipité pour le dissoudre et faire passer dans un ballon de 50 cc. Laver le verre où s'est faite la précipitation et le filtre à l'eau chaude et réunir les eaux de lavage dans le ballon de 50 cc. Laisser refroidir. Compléter à 50 cc. On obtient ainsi une solution de gélatine ou de gomme débarrassée des sucres et des édulcorants.

Prélever 10 cc. de cette solution, représentant 1 gr. de pastilles (ou $p/10$). Ajouter 30 cc. d'alcool sodé. La gomme s'il y en a précipite. Centrifuger le liquide trouble ainsi obtenu. Le tube à centrifuger doit être bouché pour éviter l'évaporation de l'alcool et réduction du volume du liquide pendant la centrifugation.

Centrifuger 5 minutes à 2.500 tours.

Doser l'azote dans le liquide clair obtenu. Pour cela mettre dans un microkjeldalh.

$$\begin{matrix} \text{10 cc. de liquide} \\ \text{2 cc. de mélange destructeur.} \end{matrix} \quad \left(\text{1/4 de gr. de pastilles au } \frac{p}{40}\right)$$

Evaporer le liquide dans le microkjeldalh, en agitant de façon constante puis, quand la masse brunit, laisser chauffer.

En un quart d'heure environ, le liquide est décoloré. Laisser chauffer encore 10 minutes et doser NH^3 formé par distillation, sur 10 cc. de SO^4H^2 N/50 à l'appareil de Parnas et Wagner. Titrer l'excès d'acide avec de la soude N/50 en présence de rouge de méthyle.

Soit n cc. de soude N/50 employés.

$$\frac{14\,(10-n) \times 40 \times 100}{50.000 \times p} = \text{Azote de la gélatine dans 100 gr. de produit.}$$

$$\text{Soit N \%} = 1{,}12\,\frac{10-n}{p}$$

$$\text{Si } p = 10 \quad \text{N \%} = 0{,}112\,(10-n).$$

On peut exprimer le résultat en gélatine commerciale (à 81%).

$$\text{teneur \%} = 1{,}12 \times 6{,}95\,\frac{10-n}{p}$$

$$\text{Soit \%} = 7{,}78\,\frac{10-n}{p}.$$

Si la quantité de gélatine est faible, on a avantage à doser N sur 20 cc. de solution centrifugée. Cette liqueur alcoolique est facile à évaporer et la quantité d'azote mise en œuvre étant doublée est d'appréciation plus facile.

Précautions. Ne faire ce dosage qu'avec des réactifs bien exempts d'azote. Une opération à blanc avec titration au Parnas, fournit une vérification rigoureuse des réactifs employés.

CHAPITRE V

Recherche et dosage de la gélatine dans les gelées, confitures et produits de confiserie.

1° Procédé Desmoulière. Recherche et dosage. 2° Recherche et dosage par le phosphotungstate. 3° Séparation de la gélatine. 4° Recherche de la gélatine dans les produits de confiserie.

1° **Procédé Desmoulière.** — RECHERCHE ET DOSAGE. — Les gelées commerciales sont souvent additionnées de substances gélogènes, gélose ou gélatine, la prise en gelée étant ainsi obtenue avec une quantité moindre de sucre, aussi il y a lieu de surveiller cette falsification. Pour la recherche et le dosage de la gélatine dans la confiture, on utilise le procédé de Desmoulière.

Le procédé de recherche indiqué par Desmoulière est le suivant :

Triturer la confiture dans de l'alcool et décanter le précipité. Caractériser dans ce précipité la gélatine par :

la réaction au tanin,
la réaction à l'acide picrique,
la réaction à la chaux vive.

Pour le dosage il insolubilise la gélatine par le formol et débarrasse le précipité des parties solubles par lavage, il pèse après dessiccation.

Pour la recherche et le dosage nous avons préféré :

Mettre la gélatine en évidence en la précipitant par l'acide phosphotungstique.

Cette réaction n'est pas spécifique, la gélose fournit égale-

ment un précipité avec l'acide phosphotungstique, nous avons complété la recherche en isolant la gélatine par l'action de l'alcool :

a) à pH 4,7,

b) en milieu alcalin.

2° **Recherche et dosage par le Phosphotungstate.** — Recherche. — Pour la recherche, nous avons utilisé la technique suivante :

Faire dissoudre 20 gr. de gelée ou de confitures dans de l'eau distillée de manière à obtenir 50 cc. de solution. Dans un tube à essai, mettre :

6 cc. de cette solution,
2 cc. de Phosphotungstate de soude à 10 %,
2 cc. de SO^4H^2 $\frac{2N}{3}$.

Dans ces conditions, la plupart des gelées ne fournissent ni trouble ni précipité. S'il ne se produit aucun trouble, on peut affirmer qu'il n'y a pas de gélatine. Si on observe un trouble, continuer la recherche en opérant de la façon suivante :

20 cc. de la solution de gelée sont mis dans 125 cc. d'alcool à 96° avec 5 cc. de solution acétique tampon à pH 4,7. Agiter. Laisser reposer. Décanter. Dissoudre le précipité dans un peu d'eau chaude. Faire sur la solution les 3 réactions suivantes :

a) Tanin,

b) Acide picrique,

c) Biuret.

Observer la tendance à la prise en gelée de cette solution.

Si ces réactions sont positives, on peut affirmer la présence de gélatine.

Dosage. — Le dosage de l'azote précipité par le phosphotungtate de soude fournira dans bien des cas des résultats intéressants :

Réactifs.

Phosphotungstate de soude à 10 %.
SO^4H^2 2N/3.

Mélange destructeur (voir page 46).
Solution N/50 de NaOH et de SO^4H^2.
Solution de rouge de méthyle.

Technique. — Faire dissoudre 10 gr. de gelée à étudier dans de l'eau distillée de manière à obtenir 50 cc.

Dans un tube à centrifuger de 30 cc. mettre :

15 cc. de solution.
5 cc. de Phosphotungstate de soude.
5 cc. de SO^4H^2 $\frac{2N}{3}$.

Laisser reposer quelques minutes ; le précipité formé s'agglomère et devient plus facile à séparer.

L'addition de 2 ou 3 cc. d'alcool favorise l'agglomération du précipité et cette addition est très utile quand il n'y a que peu de gélatine.

Centrifuger pendant cinq minutes à 2.500 tours.

Décanter le liquide clair.

Sur le précipité resté au fond du tube à centrifuger, verser 2 ou 3 cc. de soude à 10 %. Le précipité se redissout. Faire passer dans un microkjeldalh. Laver le tube à centrifuger. Réunir l'eau de lavage au contenu de Kjeldalh. Doser l'azote.

Ce procédé rapide et simple induirait en erreur dans le cas où la gelée contiendrait des substances azotées autres que la gélatine. Aussi dans certains cas il y a intérêt à séparer la gélatine.

3° **Séparation de la gélatine.** — On peut séparer la gélatine contenue dans une gelée pour la doser ensuite et cette façon d'opérer est la plus pratique lorsqu'il y a à la fois gélatine et gélose ou lorsqu'il y a des principes azotés autres que la gélatine.

Principe de la séparation. — Précipiter la gélatine par l'alcool à 96° pour éliminer les sucres et substances hydrocarbonées.

Reprendre par l'eau et éliminer la gélose de cette solution par addition d'alcool sodé.

Réactifs.

Solution acide acétique-acétate de soude M/5 pH 4,7.
Alcool à 80° contenant 40 gr. de soude par litre.
SO^4H^2 N/50 — NaOH N/50.
Mélange destructeur pour Kjeldalh, (voir page 46).
Rouge de méthyle.

Technique. — Dans un Bécher taré de 250 cc. environ, pour 10 gr. de confitures ou de gelée (ou un poids P voisin de 10 gr.). Ajouter 20 cc. d'eau. Faire dissoudre au bain-marie jusqu'à solution homogène. Ajouter 5 cc. de solution acétique tampon. Ajouter doucement en agitant 150 cc. d'alcool à 96°. Laisser reposer.

Décanter sur un petit filtre sans plis en entraînant sur le filtre aussi peu de précipité que possible.

Laver le filtre avec 15 cc. d'eau chaude en recevant l'eau de lavage dans le verre contenant le précipité. Faire dissoudre le précipité au bain-marie. Faire passer dans un ballon de 50 cc. Laver le Bécher à l'alcool sodé que l'on fait passer dans le ballon. Laisser refroidir. Compléter à 50 cc. avec l'alcool sodé. Si le liquide est trouble, le clarifier par centrifugation en tube bouché. Doser l'azote sur 10 cc. de la solution (soit sur 1/5 de la prise d'essai).

Soit n le nombre de cc. de soude N/50 employés pour neutraliser l'excès d'acide, $(10 - n)$ correspond à NH^3 formé.

L'azote de la gélatine contenue dans 100 gr. de produit

$$N\,\% = \frac{14(10-n) \times 5 \times 100}{50.000 \times p} = 0{,}14\,\frac{10-n}{p}.$$

Si on exprime le résultat en gélatine officinale (81 % de gélatine, 19 % d'impuretés)

$$\% = 0{,}14\,\frac{(10-n)}{p} \times 6{,}95 = 0{,}973\,\frac{10-n}{p}.$$

Ce procédé est utilisable dans tous les cas et on ne dose ainsi que la gélatine.

C'est le meilleur procédé en présence de gélose car la

gélose n'est pas séparée de la gélatine par le phosphotungstate.

4° **Recherche de la gélatine dans les produits de confiserie.** — Le commerce livre actuellement de nombreuses poudres destinées à la préparation rapide des crèmes, flancs, etc... qui sont le plus souvent à base de gélose.

Ces produits se présentent sous forme de poudres ou de granulés aromatisés différemment.

Pour rechercher la gélatine dans ces produits, dissoudre 5 gr. environ (p) de la poudre à étudier dans 40 cc. d'eau distillée.

Ajouter 5 cc. de solution acétique tampon. Verser la solution ainsi obtenue dans 250 cc. d'alcool à 96°. Laver le verre contenant la solution avec 10 cc. d'eau, les verser dans l'alcool.

Agiter. — Laisser reposer. — Décanter sur un filtre sans plis.

Laver le filtre avec un peu d'eau distillée. Dissoudre le précipité resté dans le verre dans cette eau de lavage. Faire passer la solution dans un ballon jaugé de 50 cc. Laver le verre. Réunir à la solution. Compléter à 50 cc.

Sur cette solution on peut faire la recherche et le dosage.

Faire sur la solution les réactions suivantes :

a) Au tanin,

b) A l'acide picrique,

c) Le biuret.

Si ces essais sont positifs on procédera au dosage de l'azote.

Pour cela, mettre dans un tube à centrifuger :

5 cc. de solution.
15 cc. d'alcool sodé.

Clarifier par centrifugation s'il y a lieu. Doser N sur 10 cc. de la solution ainsi obtenue. On obtient l'azote de la gélatine contenue dans $\frac{p}{20}$ de produit.

BIBLIOGRAPHIE

Abry. *Le sérum gélatiné dans l'étiologie du tétanos*. Thèse Pharmacie, Montpellier, 1910.

Adoue. « Notes sur les ovules au tanin. » *Union Pharmaceutique*, mars 1913, 54e a., n° 3, p. 141.

Adoff (Mme). Voir Smorodintzeff et Mme Adoff.

Adowa. Voir Smorodintzeff et A. N. Adowa.

Arcand. *Recherche sur le dosage des protides du sérum sanguin et des liquides pathologiques par la méthode à l'acétone de Piettre et Vila*. Thèse Pharmacie, Paris, 1930.

Arthus. *Chimie physiologique*, 1 vol., Masson, 1907.

Astruc. *Traité de Pharmacie galénique*, 2 vol., Maloine, 1928.

Berrar. « Contribution à la chimie et au dosage de la gélatine. » *Journ. de Physiol. et de pathol. gén.*, sept. 1913, t. XV, n° 5, p. 1059. D'après *Biochemische Zeitschrift*, XLVII, 189-219, décembre 1912.

Bigwood. « Du partage des électrolytes entre une gelée de gélatine et une solution aqueuse. » *C. R. Soc. biol.*, 1929, t. CII, n° 27, p. 322-324.

« La structure éventuelle des gelées peut-elle jouer un rôle dans leur perméabilité élective pour certains électrolytes ? » *C. R. Soc. biol.*, 1929, t. CII, n° 27, p. 324-326.

« De la perméabilité de la gelée de gélatine au chlorure de calcium. La perméabilité sélective en l'absence de membrane. » *C. R. Soc. biol.*, 1927, t. XCVI, n° 2, p. 131-135.

« De la perméabilité de la gelée de gélatine au chlorure de calcium. Caractères de la perméabilité sélective en l'absence de membrane. » *C. R. Soc. biol.*, 1927, t. XCVI, n° 2, p. 136-138.

Bigwood et R. Majmin. « Gonflement et Syrénèse de la gélatine isoélectrique. » *C. R. Soc. biol.*, 1930, t. CIV, p. 815-818.

Bigwood et Mélot. « Du degré de concentration de la matière protéique dans la gelée de gélatine. » *C. R. Soc. biol.*, 1930, t. CIV, n° 17, p. 326-329.

Bogue R. H. *Traité de chimie colloïdale*, 1er vol., Hertmann, 1928, traduction Barbaudy.

« Condition affectant l'hydrolyse du collagène en gélatine. » *Soc. chimique*, 1924, 4e série, t. XXXVI, p. 535. D'après *Ind. and Engl. chem.*, t. XV, p. 1154-1159-11-1923.

Bordas et Touplain. « Dosage des matières albuminoïdes et gélatineuses au moyen de l'acétone. » *C. R.*, 11 juin 1906, p. 1345-1346.

Bouchara. Voir Mascré et Bouchara.

Bouvet. « Gélatinisation des pilules. » *Bull. Sc. ph.*, 1920, t. XXVII, p. 634-638.

Bouvier. « Ovules et suppositoires à la glycérine. » *Bull. soc. Ph. de Bordeaux*, 1897, p. 97.

Bruzzone. « Préparation des ovules au tanin. » *Union Pharmaceutique*, août 1912, 53e année, p. 352.

Cambon V. « *La fabrication des colles et des gélatines*, 1 vol., Dunod, 1923.

Carles. « La gélatine dans les boules de gomme. » *Journ. Ph. et Chim.*, 1900, 6e série, t. XI, p. 27-28.

Carnot. « De l'Hémostase par la gélatine. » *Presse médicale*, 1897, 2e sem., p. 166-168.

Cattelain. « Analyse des glycérines solidifiées. » *Journ. de Ph. et Chim.*, 1923, 116e a., 7e série, t. XXVII, no 9, p. 365-368.

« Analyse des cendres de la gélatine. » *Journ. de Ph. et Ch.*, 1924, 116e a., 7e série, t. XXIX, no 9, p. 414-418.

« Essai de la gélatine destinée aux usages pharmaceutiques ou bactériologiques. » *Journ. de Ph. et Chim.*, 1924, 116e a., 7e série, t. XXIX, no 10, p. 444-447.

Charpentier. « Gélatines et colles. » *Encyclopédie chimique*, 1890.

Chauffard. « Rapport sur un mémoire de MM. Lop et Murat sur un cas de tétanos consécutif à l'usage de la gélatine comme hémostatique. » *Acad. de méd.*, 7 av. 1903, 3e série, t. XLIX, p. 549-562.

Chaumette. Voir Vérain et Chaumette.

Chevalier. « Sur l'état colloïdal micellaire de la gélatine. » *C. R. Soc. biol.*, 1927, t. XCVII, p. 484-485.

Collin. « Sur les propriétés des filaments de gélatine coagulée. » *C. R. Soc. biol.*, 1928, t. XCVIII, p. 1353-1355.

Cristol. « Dosage de l'azote total non protéique du sérum. Etude comparée de la désalbumination trichloracétique et métaphosphorique. » *Bull. Soc. chim. biol.*, 1922, t. IV, no 5, p. 267-271.

« Conception chimique de la désalbumination acide. » *C. R Soc. des Sc. biol. et méd. de Montpellier*, mars 1926, 7e année, p. 252-253.

Etude sur la désalbumination du sang et des humeurs en vue du dosage de l'azote total non protéique et de son exploration en physiopathologie, 1 vol., Maloine, 1928.

Cristol et Nikolitch. « Effets de la concentration des désalbuminants acides sur les protides du sang. Cas de l'acide trichloracétique. » *C. R. Soc. des Sc. biol. de Montpellier*, nov. 1923, 5e année, p. 45-48.

Cristol et Puech. « Peut-on mettre en évidence la présence de polypeptides dans le sang ? » *C. R. Soc. des Sc. biol. et méd. de Montpellier*, nov. 1925, 7e année, p. 48-52.

Cristol et Trivas. « Le dosage des acides aminés par la méthode de Folin. Influence de la désalbumination acide. » *C. R. Soc. Sc. biol. et méd. de Montpellier*, mars 1926, 7e année, p. 253.

Dastre et Floresco. Liquéfaction de la gélatine. Digestion saline de la gélatine. *Journ. de Ph. et Chim.*, 1895, 6e série, t. II, 513-525.

Denigès. « Dosage rapide de lactose dans les laits. » *Bull. soc. Ph. de Bordeaux*, 1893, 33e a., p. 48-51.

« Dosage rapide de la lactose dans les laits (*suite*). » *Bull. soc. de Ph. Bordeaux*, 1893, 33e a., p. 70-75.

« Dosage rapide de l'acide phosphorique dans les gélatines solubilisées destinées au collage des vins. » *Bull. soc. de Ph. de Bordeaux*, 1910, t. L, p. 193-195.

Denigès, Chelle et Labat. *Chimie analytique*, 2 vol., Maloine, 1931.

Desmoulière. « Recherche de la gélose et de la gélatine dans la confiture. » *Bull. Sc. pharm.*, mai 1902, 4e année, t. V, n° 5, p. 153-156.

Dhéré. « Caractères chimiques de la gélatine déminéralisée. » *Journ. de physiol. et de pathol. gén.*, mars 1911, t. XIII, n° 2, p. 157-177.

Dhéré et Gorgolewski. « Recherches sur les propriétés physico-chimiques de la gélatine déminéralisée. » *Journ. de physiol. et de pathog.*, sept. 1910, t. XII, n° 5, p. 645-656.

Dieulafoy. « Un cas de tétanos consécutif à l'injection de sérum gélatiné. » *Bull. Ac. de méd.*, mai 1903, 3e série, t. XLIX, p. 630-641.

Duclaux. *Les Colloïdes*, 2 vol., Gauthiers-Villars, 1929.

Dupouy. « Etude sur les suppositoires. » (Traduit de l'anglais, Pr. Lewin et Dr F. Eschbaum.) *Bull. soc. Pharm. de Bordeaux*, 1897, p. 84.

Durier. « Recherche de la gélatine dans les boules de gomme. » *Annales de falsifications*, 1913, n° 55, p. 255-257.

Floresco. Voir Dastre et Floresco.

François. *Manipulations de chimie analytique appliquée*, 1 vol., Le François, 1924.

Garot. « Procédé nouveau pour recouvrir les pilules d'un enduit de gélatine. » *Journ. de Ph. et de Chim.*, 1838, 2e série, t. XXIV, p. 78-80.

Girard. « A propos d'une note de E. J. Bigwood sur la perméabilité de la gelée de gélatine au chlorure de calcium. » *C. R. Soc. biol.*, 1927, t. XCVI, n° 5, p. 328-329.

Gley et Richaud. « Action de la gélatine décalcifiée sur la coagulation du sang. » *C. R. Soc. biol.* 1903, t. LV, p. 464-466.

Goiffon. « Dosage colorimétrique de l'index tyrosine des polypeptides urinaires. » *Bull. soc. chim. biol.*, déc. 1934, t. XVI, n° 10, p. 1686-1691.

Goiffon et Spaey. « Mesure de l'index tyrosine des polypeptides sériques. » *Bull. soc. chim. biol.*, déc. 1934, t. XVI, n° 10, p. 1675-1685.

Gorgolewski. Voir Dhéré et Gorgolewski.

Graaf (W. C. de) et Mlle Schapp. « Nouvelles méthodes pour la détermination quantitative des matières protéiques du lait. » *Annales des falsifications*, 1913, n° 55, p. 149-157.

Grelot. « Sur la falsification des pâtes dites boules de gomme. » *Bull. Sc. Pharm.*, mai 1906, 8e année, t. XIII, p. 242.

Grienfagen, Konig et Scholl. « Dosage de la gélatine. » *Journ. de physiol. et de pathog.*, mars 1912, t. XIV, n° 2, p. 400. D'après *Biochemiste Zeitschrift*, XXXV, 217-227, 1911.

Grigault et Zizine. « Etude de la désalbumination par l'acide métaphosphorique. Application à l'analyse du sang des liquides pathologiques

et du liquide céphalo-rachidien. » *Bull. soc. chim. biol.*, t. XIV, n° 7, p. 388-406.

Guérithault. Voir Javillier et Guérithault.

Guillaumin Ch., R. Walh et M. L. Laurencin. « Sur le dosage des albumines sériques. Comparaison de quelques résultats obtenus par pesée par azotométrie et par réfractométrie. » *Bul. soc. chim. biol.*, 1929, t. XI, p. 387-389.

Herbain. Voir Mascré et Herbain.

Hoppe Seyler und Thierfelder. « Handbüch der Physiologish und pathologisch chemischen. » *Analyse*, 1924, p. 488.

Javillier et Guérithault. « Sur la distinction de peptones médicinales d'origine pepsique au pancréatique. » *Bull. Sc. pharm.*, fév. 1910, t. XVIII, n° 2, p. 63-71.

Jung. Voir Porcher et Jung.

Laurencin M. L. Voir Guillaumin, R. Walh et M. L. Laurencin.

Lebeau et Courtois. *Traité de Pharmacie chimique*, 2 vol., Masson, 1929.

Lépinois et Michel. « Préparation magistrale des capsules gélatineuses. *Bull. Sc. pharm.*, 1899-1900, t. I, p. 492-495.

Lespagnol. Voir Polonovsky et Lespagnol.

Levène P. A. « Sur le dédoublement de la gélatine (I) teneur des gélatoses englycocolle. » « *Bull. sc. pharm.*, mars 1903, 5e année, t. VIII, n° 3, p. 17. D'après *Zeit f. physiol chem.*, Strasbourg, 1902, XXXVII, p. 81 86.

« Sur l'hydrolyse de la gélatine. » *Bull Sc. pharm.*, nov. 1904, 6e année, n° 2, t. X, p. 312. D'après *Zeit f. physiol. chem.*, Strasbourg, 1904, XLI, 8-15.

Lœb. *Les protéines*, traduit par Mouton, 1 vol., Alcan, 1923.

« Chimie générale et chimie colloïdale des solutions de gélatine. » *Journ. de Chim. Phys.*, t. XVIII, 1920, p. 283-297.

Lumière et Seyewetz. « Sur les phénomènes de précipitation et d'insolubilisation de la gélatine » *Soc. chim.*, 1908, 4e série, t. III, p. 743-750.

Malenfant. « Analyse d'un échantillon de pastilles de gomme et étude d'une nouvelle falsification. » *Journ. de Pharm. et de Chimie*, mai 1911, 103e année, 7e série, t. III, n° 10, p. 484-489.

Majmin. Voir Bigwood et Majmin.

Mascré et Bouchara. « Influence du formol sur la précipitation des matières albuminoïdiques du lait. » *Bull. soc chim. biol.*, 1930, t. XII, p. 994-1000.

Mascré et Herbain. « Influence du formol sur la précipitation des albumines sériques. » *Bull. soc. chim. biol.*, 1930, t. XII, p. 978-994.

Melot. Voir Bigwood et Melot.

Meunier. « Les propriétés de la gélatine. » *Chim. et Ind.*, juin 1921, vol. V, p. 642-650.

Meunier et Seyewetz. « Sur les phénomènes de précipitation et d'insolubilisation de la gélatine. » *Mon. scientif. du Dr Quesneville*, 4e sér., t. XXXIII, p. 91-94, 1909.

Michel. Voir Lépinois et Michel.

Moog « Nouveau procédé de dosage dans le sérum de l'azote libérable par l'hypobromite de soude. » *C. R. soc. biol.*, mars 1912, t. LXXII, n° 10, p. 386-388.

Moraczewski. « Sur le gonflement de la gélatine dans les solutions acides. » *C. R. soc. biol.*, 1930, t. CIV, n° 17, p. 314-316.

« Sur le gonflement de la gélatine dans les solutions salines. » *C. R. soc. biol.*, 1930, t. CIV, n° 17, p. 316-319.

Moraczewski et St. Grzycki. « Sur la distribution des cations et des anions pendant le gonflement de la gélatine dans les milieux acides ou alcalins. » *C. R. soc. biol.*, 1931, t. CVII, n° 21, p. 878-882.

Olmedilla et Puig. « Ovules transparents à l'acide tannique. » *Union pharm.*, avril 1913, 54e année, n° 4, p. 188.

« Formules pour préparer les ovules au tanin. » *Union pharm.*, déc. 1913, 54e année, n° 12, p. 542.

Namias. « Action des composés chromiques sur la gélatine. » *Bull. Sc. pharm.*, t. V, p. 320 D'après *Boll. chim. farm.*, Milano, 1902, XLI, p. 525-528.

Padé. « Dosage de l'acide sulfureux dans les matières alimentaires et en particulier dans la gélatine. » *Ann. de Chim. anal.*, an. 1908, t. XIII, p. 299-301.

Pégurier. « Le soluté salin de gélatine. » *Bull. de la soc. de Ph. du Sud-Est*, août 1910, 15e année, p. 377-379.

Perret. « La gélatine. » *Dictionnaire de physiologie Ch. Richet*, t. VII, 1907, p. 42.

Pégou. *Contribution à l'étude de la gélatine dans l'alimentation.* Thèse Vét., Lyon, 1931-1932.

Piettre. « Séparation des protéides du blanc d'œuf par la méthode à l'acétone. » *C. R.*, 1924, t. 178, n° 1, p. 91-93.

« Errata relatif à cette communication. » *C. R.*, t. 178, n° 3, p. 348.

« Sur les protéides du lactosérum. Leur séparation par la méthode à l'acétone. » *C. R.*, 1924, t. 178, n° 3, p. 333-335.

Piettre et Vila. « Application de la méthode à l'acétone à la séparation et à l'étude des matières protéiques dans l'albuminurie. » *Journ. de Pharm. et Chim.*, 1926, 118e an., 8e série, t. III, n° 3, p. 97-100.

« Sur la séparation des protéides du sérum. » *C. R.*, 1920, t. 170, p. 1466.

Petitjean. « Remarques sur les manipulations préparatoires au dosage des acides aminés dans le sang. » *Bull. soc. chim. biol.*, 1922, t. IV, n° 2, p. 108-114.

Polonovski et Lespagnol. *Chimie organique biologique*, 1 vol., Masson, 1934.

Porcher et Jung. « Valeur nutritive comparée de l'ovalbumine et de la gélatine utilisés comme éléments organiques exclusifs. » *C. R. Soc. biol.*, 1929, t. CI, n° 23, p. 824 825.

Puig. Voir Omedilla et Puig.

Richaud. Voir Gley et Richaud.

Romme. « Le sérum artificiel gélatiné et son emploi en thérapeutique. » *Rev. int. de Méd. et de Chir.*, 1898, 9e année, p. 401-405.

Rousseau. « Influence des sels de Ca sur la solidification de la gélatine stérilisée à 120°. » *Bull. Sc. pharm.*, 1903, 5e année, t. VII, n° 9, p. 310-314.

Salmon. *La gomme arabique dans la confiserie pharmaceutique*, Thèse Pharmacie, Paris, 1930.

St. Grzycki. Voir Moraczewski et St. Grzycki.

St. Przylecki. « Action des électrolytes et de l'alcool sur la gélatine au-dessous du point isoélectrique de Michaélis. » *C. R. Soc. biol.*, 1930, t. CVI, p. 134-136.

« Action des électrolytes et de l'alcool sur la gélatine au point isoélectrique et au delà de ce point. » *C. R. Soc. biol.*, 1930, t. CIV, p. 1077-1080.

Schapp Mlle. Voir Graaf (W. C. de) et Mlle Schapp.

Seyewetz. Voir Lumière et Seyewetz.

Voir Meunier et Seyewetz.

Smorodintzeff et Mme Adoff. « Limites de la précipitation de la gélatine par le tanin. » *Soc. chimique*, 1926, t. XL, p. 836. D'après *Journ. Soc. chim. russe*, t. LXVII, p. 124-126, 1926.

Smorodinzew et A. N. Adowa. « Sur les limites de précipitation de la gélatine par le tanin. » *Soc. chim.*, 1926, t. XL, 4e série, p. 1029. D'après *Zeit. Physiol. Chem.*, t. 144, p. 255-258, 1925.

Spaey. Voir Goiffon et Spaey.

Stiasny. « Influence des sels neutres sur la gélatine. » *Soc. chim.*, 1926, 4e série, t. XL, p. 264. D'après *Koll-Zeit*, t. XXXV, p. 353-358, 1924.

Thierfelder. Voir Hoppe Seyler et Thierfeld.

Touplain. Voir Bordas et Touplain.

Triollet. « La stérilisation du sérum gélatiné. » *Bull. Sc. ph.*, 5e année, 1903, t. VIII, no 6, p. 119-120.

Trivas. Voir Cristol et Trivas.

Valdiguié P. « Etude comparée du taux des peptides dans le sang et dans les liquides pathologiques. » *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, t. XVI, no 4, p. 499-526.

Vamvakas. « Action du réactif de Nessler sur les gommes et la gélatine. » *Ann. de chim. anal.*, 1907, t. XII, no 1, p. 12-13.

« Recherche de la gélatine dans le sirop de gomme. » *Ann. de Chim. anal.*, 1907, t. XII, no 4, p. 133-140.

Vée. « Modification au procédé Garot pour recouvrir les pilules d'un enduit de gélatine. » *Journ. de Ph. et de Chim.*, 1840, p. 585.

Vérain et Chaumette. *Le* pH *en biologie*, 1 vol., Masson, 1930.

Vézien. *Industrie des os, des déchets animaux des phosphates et du phosphore*, 1 vol., Doin, 1914.

Viel. « Préparation du sérum gélatiné. » *Journ. de Ph. et de Ch.*, 1903, 6e série, t. XVIII, p. 199-203.

Vila. « Influence de la chaleur et de quelques dissolvants sur la viscosité du sérum de cheval. » *C. R.*, 1922, t. 174, p. 1131-1133.

« Séparation des globulines du sérum de cheval. » *C. R.*, 1922, t. 175, no 17, p. 728-731.

Voir Piettre et Vila.

Voissins. « Formules pour la préparation des ovules, suppositoires, bougies, à base de gélatine et de glycérine » *Journ. de Ph. et de Ch.*, 1903, 6e série, t. XVII, p. 408.

Walh. Voir Guillaumin Ch. O., R. Walh et M. L. Laurencin.

Zizine. Voir Grigault et Zizine.

TABLE DES MATIÈRES

Pages.

INTRODUCTION. 1

PREMIÈRE PARTIE

Etude générale de la gélatine.

CHAPITRE I. Collagènes et gélatines. Gélatines et colles animales. 5
CHAPITRE II. Préparation de la gélatine. 7
CHAPITRE III. Composition de la gélatine. 12
CHAPITRE IV. Propriétés physico-chimiques des solutions de gélatine. 15
CHAPITRE V. Gelées. Gonflement 20
CHAPITRE VI. Caractères chimiques de la gélatine et de ses solutions. 24

DEUXIEME PARTIE

Précipitation de la gélatine par les liquides neutres : liquides organiques neutres, solutions salines.

CHAPITRE I. Précipitation de la gélatine par l'alcool éthylique . 37
CHAPITRE II. Précipitation de la gélatine par l'acétone. 53
CHAPITRE III. Précipitation de la gélatine par les solutions salines concentrées. 61

TROISIÈME PARTIE

Précipitation de la gélatine par les désalbuminants acides.

CHAPITRE I. La désalbumination acide. 71
CHAPITRE II. Précipitation de la gélatine par l'acide métaphosphorique. 72
CHAPITRE III. Précipitation de la gélatine par l'acide trichloracétique. 80

Pages.

Chapitre IV. Précipitation de la gélatine par l'acide tungstique. . 88
Chapitre V. Précipitation de la gélatine par l'acide phosphotungstique. 93
Chapitre VI. Conclusions. Applications au dosage 95

QUATRIÈME PARTIE

Dosage de la gélatine dans les substances pharmaceutiques et alimentaires.

Chapitre I. La gélatine officinale. Essai. 99
Chapitre II. Glycérine gélatinée. 117
Chapitre III. Sérum gélatiné. 128
Chapitre IV. La gélatine dans les boules de gomme. 130
Chapitre V. Recherche et dosage de la gélatine dans les gelées, les confitures et les produits de confiserie. . . . 135
Bibliographie. 141

QUESTIONS POSÉES PAR LA FACULTÉ

I. - Les ovules au tanin.

II. - Les protéines incomplètes du point de vue alimentaire.

III. - Toxicologie des carbures acycliques.

Vu :
Le Président du Jury de Thèse,
A. VALDIGUIÉ.

Vu :
Le Doyen,
BARDIER.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 3 Mars 1936
Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
J. GHEUSI.

Poitiers. — Société française d'Imprimerie et de Librairie.